

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**Estudo da toxicidade aguda, subaguda, genotóxica e mutagênica do extrato
liofilizado das folhas da *Campomanesia sessiliflora* (O.Berg) Mattos em
ratos Wistar**

ANAHY ARRUDA BURIGATO

**Dourados – MS
2022**

ANAHY ARRUDA BURIGATO

**Estudo da toxicidade aguda, subaguda, genotóxica e mutagênica do extrato
liofilizado das folhas da *Campomanesia sessiliflora* (O.Berg) Mattos em
ratos Wistar**

Área do CNPq: Ciências da Saúde: 04.00.00.00-1

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Área de concentração: Farmacologia.

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Silvia Aparecida Oesterreich.

Dourados - MS
2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

B958e Burigato, Anahy Arruda
Estudo da toxicidade aguda, subaguda, genotóxica e mutagênica do extrato liofilizado das folhas da *Campomanesia sessiliflora* (O.Berg) Mattos em ratos Wistar [recurso eletrônico] / Anahy Arruda Burigato. -- 2023.
Arquivo em formato pdf.

Orientadora: Silvia Aparecida Oesterreich.
Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde)-Universidade Federal da Grande Dourados, 2023.
Disponível no Repositório Institucional da UFGD em:
<https://portal.ufgd.edu.br/setor/biblioteca/repositorio>

1. Plantas medicinais. 2. *Campomanesia sessiliflora*. 3. Micronúcleo. 4. Ensaio cometa. 5. Toxicidade. I. Oesterreich, Silvia Aparecida. II. Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

©Direitos reservados. Permitido a reprodução parcial desde que citada a fonte.



ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO APRESENTADA POR ANAHY ARRUDA BURIGATO, ALUNA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM CIÊNCIAS DA SAÚDE, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO "FARMACOLOGIA".

Aos dois dias do mês de março do ano de dois mil e vinte e três, às quatorze horas, em sessão pública, realizou-se na Universidade Federal da Grande Dourados, a Defesa de Dissertação de Mestrado intitulada **"Estudo da toxicidade aguda, subaguda, genotóxica e mutagênica do extrato liofilizadodas folhas da Campomanesia sessiliflora (O.Berg) Mattos em ratos Wistar"**, apresentada pela mestranda Anahy Arruda Burigato, do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, à Banca Examinadora constituída pelos membros: Prof.ª Dr.ª Sílvia Aparecida Oesterreich/UFGD (presidente/orientador), Prof. Dr. Pablo Christiano Barboza Lollo/UFGD (membro titular interno), Prof. Dr. Gustavo Roberto Villas Boas/UFOB (membro titular externo). Iniciados os trabalhos, a presidência deu a conhecer ao candidato e aos integrantes da banca as normas a serem observadas na apresentação da Dissertação. Após a candidata ter apresentado a sua Dissertação, os componentes da Banca Examinadora fizeram suas arguições. Terminada a Defesa, a Banca Examinadora, em sessão secreta, passou aos trabalhos de julgamento, tendo sido a candidata considerada APROVADA. O Presidente da Banca atesta a participação dos membros que estiveram presentes de forma remota, conforme declarações anexas. Nada mais havendo a tratar, lavrou-se a presente ata, que vai assinada pelos membros da Comissão Examinadora.

Dourados/MS, 02 de março de 2023.

Documento assinado digitalmente
gov.br
SILVIA APARECIDA OESTERREICH
Data: 08/03/2023 23:06:31-0300
Verifique em <https://verificador.itl.br>

Prof.ª Dr.ª Sílvia Aparecida Oesterreich
Presidente/orientador
(Participação Remota)

Documento assinado digitalmente
gov.br
PABLO CHRISTIANO BARBOZA LOLLO
Data: 08/03/2023 15:23:29-0300
Verifique em <https://verificador.itl.br>

Prof. Dr. Pablo Christiano Barboza Lollo
Membro Titular Interno
(Participação Remota)

Documento assinado digitalmente
gov.br
Gustavo Roberto Villas Boas
Data: 08/03/2023 14:55:15-0300
Verifique em <https://verificador.itl.br>

Prof. Dr. Gustavo Roberto Villas Boas
Membro Titular Externo
(Participação Remota)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha avó materna, Petronilha Maciel de Arruda (*in memoriam*), professora, que sempre foi meu exemplo e modelo, me instruiu e me conduziu no bom caminho, na vida e nos estudos, sendo inspiração e base de toda minha formação como ser humano.

Dedico também aos meus filhos, Marco Túlio Burigato Vieira e Otávio Augusto Burigato Vieira, para que saibam que o estudo é um bom e gratificante caminho a seguir.

AGRADECIMENTO

Agradeço à minha orientadora Silvia Aparecida Oesterreich por ter acreditado no meu potencial e por todos ensinamentos.

Agradeço ao meu marido Jacenir Vieira da Silva, pelos ensinamentos, por todo auxílio e parceria, durante todo o processo.

Agradeço a amiga que fiz na pós-graduação Larissa Pires Mueller, pela amizade alegre, leve e por toda parceria durante todo o curso.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

ARTIGO I

Graphical Abstract	23
--------------------	----

ARTIGO II

Graphical Abstract	37
--------------------	----

Figure 1 - Weight progression between saline control (SC) and <i>C. sessiliflora</i> (C.S) group in acute toxicity. Values expressed as Mean \pm SEM.	44
---	----

Figure 2 - Chow and water consumption between saline control (SC) and <i>C. sessiliflora</i> (C.S) group in acute toxicity. Values expressed as Mean \pm SEM.	45
---	----

Figure 3 - Subacute weight progression between male and female rats in subacute toxicity protocol. Values expressed as Mean \pm SEM.	45
--	----

Figure 4 - Weight gain, chow and water consumption between male and female rats in subacute toxicity protocol. Values expressed as Mean \pm SEM.	46
--	----

Figure 5 - Organs Weight in males and females at the end of subacute toxicity protocol. Values expressed as Mean \pm SEM.	50
---	----

Figure 6 - Comet Assay in male and female at the end of subacute toxicity protocol. Values expressed as Mean \pm SEM.	52
---	----

Figure 7 - Micronucleus assay in male and female at the end of subacute toxicity protocol. Values expressed as Mean \pm SEM.	53
--	----

LISTAS DE TABELAS

ARTIGO II

Table 1 - Biochemicals parameters in male and female rats in subacute toxicity protocol	48
Table 2 - Hematological parameters in male and female rats in subacute toxicity protocol	48
Table 3- Histopathological analysis at the end of subacute toxicity protocol.	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

CLAE – DAD	Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos – <i>High performance liquid chromatography with diode array detector</i>
<i>C. sessiliflora</i>	<i>Campomanesia sessiliflora</i>
DL50	Dose letal para 50% dos animais
MN	Micronúcleo
OECD	Organização para Cooperação Econômica e Desenvolvimento - <i>Organization for Economic Cooperation and Development</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
FDA	Administração de Alimentos e medicamentos - <i>Food and Drugs Administration</i>

**Estudo da toxicidade aguda, subaguda, genotóxica e mutagênica
do extrato liofilizado das folhas da *Campomanesia sessiliflora*
(O.Berg) Mattos em ratos Wistar**

RESUMO

O Cerrado brasileiro é rico em biodiversidade, especialmente na flora, com muitas espécies que são utilizadas na prevenção e no tratamento de doenças. Sabe-se que somente o uso empírico não é suficiente para validar a segurança de uma planta medicinal. Os estudos de toxicidade são necessários para avaliar os possíveis efeitos adversos, estimando maior segurança para o uso. A *Campomanesia sessiliflora* (O.Berg) Mattos, popularmente conhecida como guabiroba-verde, é uma espécie comum na região centro-oeste e sudeste do Brasil, utilizada e consumida pela população local, com propriedades nutricionais e farmacológicas, possivelmente atribuídas a bioatividade dos metabólitos secundários descritos nesta espécie. Este estudo teve como objetivo avaliar a toxicidade pré-clínica da *C. sessiliflora* em ratos Wistar adultos. Na avaliação da toxicidade aguda e estimativa da DL50 foram utilizadas 10 fêmeas, nas quais foi administrada a dose de 2000mg/kg do extrato liofilizado das folhas de *C. sessiliflora*. Para a avaliação da toxicidade subaguda e potencial genotóxico e mutagênico foram utilizados 70 ratos, sendo 35 fêmeas e 35 machos, subdivididos em grupo controle negativo, controle positivo, grupo satélite, e 4 grupos testes nas doses de 125mg/kg, 250mg/kg, 500mg/kg e 1000mg/kg do extrato liofilizado das folhas de *C. sessiliflora*, administradas por 28 dias consecutivos. Para análise dos resultados foi utilizada análise de variância (ANOVA) seguido de teste Tukey considerando-se o valor de significância $p < 0,05$. No teste de toxicidade aguda, não houve alterações no estado comportamental, físico e fisiológico dos animais tratados com *Campomanesia sessiliflora* (O.Berg) Mattos e o grupo controle negativo ($p \geq 0,05$). O extrato de folhas de *Campomanesia sessiliflora* (O.Berg) Mattos não apresentou toxicidade aguda e subaguda *in vivo* detectável em alterações de comportamento, ganho de peso e consumo de ração e água. Entretanto, as respostas bioquímicas à intervenção do extrato (ácido úrico, triglicerídeos e parâmetros hematológicos) parece sofrer influência do sexo do animal. Além disso, foi possível reportar que

doses superiores a 500mg/kg apresentam algum grau de genotoxicidade e mutagenicidade *in vivo* por meio do ensaio cometa e micronúcleo, respectivamente.

Palavras-chave: Plantas medicinais. *Campomanesia sessiliflora*. Micronúcleo. Ensaio cometa. Toxicidade.

**Study of the acute, subacute, genotoxic and mutagenic toxicity of
the lyophilized extract of the leaves of *Campomanesia sessiliflora*
(O.Berg) Mattos in Wistar rats**

ABSTRACT

The Brazilian Cerrado is rich in biodiversity, especially in flora, with many species used to prevent and treat diseases. It is known that empirical use alone is not enough to validate the safety of a medicinal plant. Toxicity studies are necessary to assess possible adverse effects, estimating more excellent protection for use. *Campomanesia sessiliflora* (O.Berg) Mattos, popularly known as guabiroba-verde, is a common species in central-west and southeastern Brazil, used and consumed by the local population, with nutritional and pharmacological properties possibly attributed to the bioactivity of metabolites. Secondary species are described in this species. This study aimed to evaluate the preclinical toxicity of *C. sessiliflora* in adult Wistar rats. In evaluating acute toxicity and estimation of LD50, 10 females were used, in which a dose of 2000mg/kg of lyophilized extract of *C. sessiliflora* leaves was administered. For the evaluation of subacute toxicity and genotoxic and mutagenic potential, 70 rats were used, 35 females and 35 males, subdivided into negative control group, positive control, satellite group, and 4 test groups at doses of 125mg/kg, 250mg/kg, 500mg/kg and 1000mg/kg of a lyophilized extract of *C. sessiliflora* leaves, administered for 28 consecutive days. Analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey test was used to analyze the results, considering the significance value $p < 0,05$. The extract of leaves of *Campomanesia sessiliflora* (O.Berg) Mattos does not show acute and subacute in vivo toxicity detectable in changes in behavior, weight gain, and feed and water consumption. However, the biochemical responses to the intervention of the extract (uric acid, triglycerides, and hematological parameters) seem to be influenced by the sex of the animal. In addition, it was possible to report that doses greater than 500 mg/kg present some degree of genotoxicity and mutagenicity in vivo by means value of the comet and micronucleus assay, respectively.

Keywords: Medicinal plants. *Campomanesia sessiliflora*. Microkernel. Comet assay. Toxicity.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	09
2 REVISÃO DE LITERATURA	10
2.1 Considerações gerais sobre a <i>Campomanesia sessiliflora</i> (O.Berg) Mattos	10
2.2 Ensaios pré-clínicos de toxicidade de produtos naturais	13
2.2.1 Avaliação da Toxicidade Aguda e Subaguda	13
2.2.2 Teste de Micronúcleo e Ensaio Cometa	15
3 OBJETIVOS	17
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	18
5 APÊNDICES	21
5.1 Artigo 1: <i>Campomanesia sessiliflora</i> (O.BERG) Mattos: a literature review	22
5.2 Artigo 2: Estudo da toxicidade aguda, subaguda, genotóxica e mutagênica da <i>Campomanesia sessiliflora</i> (O.Berg) Mattos em ratos Wistar.	35
6 ANEXOS	64
6.1 Aprovação do Comitê de ética (CEUA)	65
6.2 Fotos	66

1. INTRODUÇÃO

As plantas medicinais podem apresentar muitas atividades biológicas benéficas, mas também possuir compostos com atividades citotóxicas, mutagênicas e/ou genotóxica que podem interagir com o DNA e ocasionar o surgimento de mutações nas células (CAMPOS et al, 2016). No início dos anos 80, os órgãos de saúde pública e as agências ambientais, em vários países industrializados, acrescentaram a mutagenicidade à lista das propriedades tóxicas a serem avaliadas antes que medicamentos fossem introduzidos no mercado, consolidando assim o desenvolvimento da Genética Toxicológica (DOLL & PETO, 1981). Embora seja grande a busca e estudos para obtenção de novos medicamentos com maior eficácia para o tratamento de câncer, os avanços não têm sido satisfatórios, pois esta é uma doença que traz grandes prejuízos às células por sua agressividade, como também pela toxicidade medicamentosa da terapia (RAFFERTY et al., 1996; NEWMANN, 2003). Estudos sobre mutagenicidade são alvos crescentes de investimentos científicos em âmbito nacional e mundial, tendo observado a relação entre mutação e câncer (CARDOSO, 2006). A avaliação da mutagenicidade, citotoxicidade e genotoxicidade pode ser feita através dos ensaios do micronúcleo em medula óssea hematopoiética de ratos, e pelo teste cometa. Ambas as metodologias são amplamente aceitas pelas agências regulatórias, bem difundidas e bastante empregadas pela comunidade científica, fornecendo também dados sobre o risco e segurança ao se fazer o uso de uma substância (VARANDA, 2006).

Campomanesia sessiliflora (O.Berg) Mattos é uma espécie do gênero *Campomanesia* da família Myrtaceae, popularmente conhecida como guabiroba verde. O gênero *Campomanesia* é amplamente distribuído no Cerrado brasileiro, onde *C. sessiliflora* é encontrada em regiões de campos do Brasil central, em Minas Gerais e Mato Grosso do Sul, considerado uma fonte promissora de polifenóis para aplicações nutraceuticas e/ou farmacêuticas. Contudo a espécie *C. sessiliflora*, carece de estudos farmacológicos e biológicos sobre as suas ações bem como sua segurança farmacológica (LESCANO, et al, 2019; KATAOCA & CARDOSO, 2013; WFO, 2022).

Considerando a necessidade de conhecimento sobre a toxicidade de plantas medicinais, o potencial nutraceutico descrito para o fruto do *C. sessiliflora* e, ainda, a falta de estudos que determinem a ação tóxica desta espécie, este estudo

objetivou avaliar a toxicidade pré-clínica do extrato liofilizado das folhas de *C. sessiliflora* em ratos Wistar, seguindo a recomendação da OECD.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Considerações gerais sobre a *Campomanesia sessiliflora* (O.Berg) Mattos

Os biomas do Centro-Oeste brasileiro, Pantanal e Cerrado, apresentam uma miríade de potenciais em diversidade biológica (DE JESUS, et al, 2020). O Cerrado é o segundo maior bioma brasileiro, caracterizado pelo planalto de florestas, pastos, savanas, matas de galeria e secas do Brasil central. O clima é sazonal, a precipitação média anual é de 1500 mm (CRISPIM, et al, 2019). Corresponde a cerca de 21% do território nacional e possui cerca de 12.000 espécies de plantas (DE JESUS, et al, 2020). Apresenta enorme diversidade de espécies nativas que tem alto potencial econômico para a indústria farmacêutica e alimentícia (CRISPIM, et al, 2019). Diversas dessas espécies são utilizadas na prevenção e no tratamento de doenças (BOAS, et al, 2018).

Muitas moléculas bioativas já foram identificadas em plantas desse bioma, no entanto, a flora do Cerrado ainda oferece uma grande variedade de espécies que permanecem inexploradas. Por isso, o Cerrado ainda é uma promissora fonte de produtos naturais que carecem de investigação quanto ao seu potencial farmacológico (DE JESUS, et al, 2020).

Dentre essas plantas medicinais do Cerrado, salientamos as espécies da família Myrtaceae, que compreende em todo o mundo, aproximadamente 140 gêneros e cerca de 6000 espécies que ocorrem em regiões tropicais e subtropicais em todo o globo, mas principalmente na América do Sul e na Austrália. No Brasil, existem 29 gêneros e 1193 espécies registradas, dessas, 784 são endêmicas (DA SILVA PITTARELLI; MOURAO; THADEO, 2021). Dessa família, 211 espécies são encontradas no bioma Cerrado (SÁ, et al, 2018).

A família Myrtaceae é reconhecida por apresentar espécies com elevados teores de compostos bioativos, especialmente carotenoides e fenólicos. A parte comestível dos frutos possuem altos teores fitoquímicos, como polifenóis e ácidos orgânicos. Os extratos de suas frutas apresentam alto potencial antioxidante. Já as folhas são utilizadas na medicina popular para tratamento de doenças (DE

OLIVEIRA RAPHAELLI, et al, 2021).

Campomanesia é um gênero bem definido da família Myrtaceae (DA SILVA PITTARELLI; MOURAO; THADEO, 2021). É bastante estudado por suas aplicações terapêuticas e apresenta substâncias químicas com atividade biológica (CATELAN, et al, 2019). Suas espécies possuem propriedades nutricionais e farmacológicas, com bioatividade relacionada aos seus metabólitos secundários descritos em inúmeras pesquisas (BOAS, et al, 2018). Entre as espécies frutíferas com potencial agrícola, nutricional ou farmacológico, espécies de *Campomanesia* tem seus frutos consumidos in natura ou processados. São relevantes para economia da região Centro-oeste e apresentam alto valor nutritivo. (BOAS, et al, 2018). Este gênero tem magnânima importância para o estado do Mato Grosso do Sul, resultando na Lei 5.082 de novembro de 2017, que considera esse fruto, a guavira, como símbolo do Estado (DE CASTRO, et al, 2020).

O gênero *Campomanesia* tem 36 espécies, desses, 31 são espécies presentes na flora do Brasil e 14 são encontrados no bioma Cerrado (SÁ, et al, 2018). São árvores e arbustos, distribuídos, além do Brasil, em países como Argentina, Peru, Equador e Colômbia (LIMA; GOLDENBERG; SOBRAL, 2011). É um gênero considerado como boa fonte de polifenóis, que lhe conferem atividades anti-inflamatória, antidiabética, antimicrobiana, antiproliferativa e apoptótica, bem como efeitos protetores gástricos e cardiovasculares. Tais atividades estão relacionadas aos compostos químicos quercetina, miricetina, e a catequina, fenólicos estes que lhe conferem possibilidades de utilizações nutracêuticas e farmacêuticas (LESCANO, et al, 2019). Estudos químicos demonstraram altas quantidades de compostos fenólicos, antioxidantes e óleos voláteis (limoneno e vitamina C) nas frutas desse gênero (DA SILVA PITTARELLI; MOURAO; THADEO, 2021).

Destacamos a espécie *Campomanesia sessiliflora*, que é conhecida popularmente pelo nome de guabiroba verde (DE JESUS, et al, 2020). É encontrada no Paraguai e no Brasil (LIMA; GOLDENBERG; SOBRAL, 2011). É uma espécie nativa no Brasil (CARDOSO; KATAOKA; RÉ-POPPI, 2010) e é encontrada em cerrados e campos do Brasil central, Minas Gerais e Mato Grosso do Sul (KATAOKA & CARDOSO, 2013). O período de floração é em maio, outubro, novembro e dezembro. Os frutos são coletados em maio e dezembro (LIMA; GOLDENBERG; SOBRAL, 2011). Produz frutos comestíveis de polpa

suculenta, firme e sabor doce que são consumidos pela população na forma in natura (DE JESUS, et al, 2020) (KATAOKA & CARDOSO, 2013). Suas folhas são utilizadas pela população em forma de chá (infusão) (DE CASTRO, et al, 2020) para tratamento de diarreia, patologias da bexiga e doenças dermatológicas (CARDOSO; KATAOKA; RÉ-POPPI, 2010), tem enorme importância sócio, cultural e econômica, gerando impacto na saúde da população local (DE CASTRO, et al, 2020). A *C. sessiliflora* (O.Berg) Mattos é uma espécie pouco estudada, este fato reforça a necessidade de compilação para compreender o verdadeiro valor medicinal desta espécie de planta. (BOAS, et al, 2018).

Em estudo sobre sua composição, a infusão das folhas da *C. sessiliflora* apresentou $106,50 \pm 10,10$ mg g⁻¹ de compostos fenólicos, $47,58 \pm 0,20$ mg g⁻¹ de flavonoides e $0,22 \pm 0,01$ mg g⁻¹ de taninos. O extrato mostrou ação antioxidante, fotoprotetora e efeito antiproliferativo, inibindo a divisão celular (DE CASTRO, et al, 2020).

Foram identificados os principais compostos constituintes do óleo essencial obtido das folhas da *C. sessiliflora* (O. Berg) Mattos: biciclogermacreno (22,4%), espatulenol (15,9%) e germacreno D (14,6%) (SÁ, et al, 2018). Análise feita através de cromatografia gasosa e espectrometria de massa por cromatografia em fase gasosa identificou 37 componentes no óleo dos frutos de *Campomanesia sessiliflora*. O óleo apresentou grande quantidade de sesquiterpenos. Os principais constituintes foram eramledol (18,9%), globulol (8,9%), α -cadinol (7,0%) e epi- α -muurolol (5,1%) (CARDOSO; KATAOKA; RÉ-POPPI, 2010). O óleo essencial da *C. sessiliflora*, apresentou teores semelhantes de mono e sesquiterpenos (por volta de 42% de cada classe), onde α – pineno foi o monoterpene predominante (38,65%), enquanto β – cariofileno (13,35%) e aromadendrene (12,52%) foram os principais componentes do tipo sesquiterpeno (DE JESUS, et al, 2020).

A avaliação do perfil cromatográfico obtidos por CLAE-DAD (cromatografia líquida de alta eficiência acoplados ao detector de arranjo de diodo) e da atividade antioxidante das folhas detectou que o teor de fenóis foi superior ao teor de flavonoides em todas as análises. Os extratos orgânicos e infusos das folhas que foram coletadas durante o período reprodutivo apresentaram teores de fenóis e de flavonoides superiores (KATAOKA & CARDOSO, 2013). Esses compostos bioativos fenólicos e flavonoides estão sendo testados para a função de proteção solar (DE OLIVEIRA RAPHAELLI, et

al, 2021). Em estudo de avaliação do potencial fotoprotetor in vitro, o extrato hidroetanólico as folhas da *C. sessiliflora* apresentaram substâncias com absorção na região de 200-450 nm. O extrato etanólico na concentração de 8% apresentou absorção nas regiões UVA e UVB, demonstrando potencial para produtos fotoprotetores ou multifuncionais (CATELAN, et al, 2019).

O óleo essencial da *C. sessiliflora* apresentou boa atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus* sp. multiresistente 841, que foi isolado de leite de vaca com mastite bovina. Também se mostrou moderadamente ativa contra *Staphylococcus* sp. 873, cepas padrão de *P. aeruginosa*, *S. aureus*, e de *E. coli*. Contra as cepas produtoras de β -lactamase *E. coli* e *Salmonella typhi* 905, também apresentou atividade moderada (DE JESUS, et al, 2020).

Considerando-se que em vários estudos, a espécie mostrou efeitos biológicos e presença de constituintes importantes, faz-se necessário a análise da segurança farmacológica, determinação de dose segura para o uso popular, além da síntese e prospecção de novos fármacos.

2.2 Ensaios pré-clínicos de toxicidade de produtos naturais

2.2.1 Avaliação da Toxicidade Aguda e Subaguda

Os estudos pré-clínicos oferecerem informações fundamentais para o desenvolvimento de tratamentos seguros e eficazes para a prática clínica (DELP-HAN, et al, 2022). O objetivo desse tipo de estudo é principalmente avaliar quais os riscos para determinado tratamento em humanos (SANGARAJU, et al, 2022).

Os testes de toxicidade têm como objetivo avaliar o potencial tóxico de determinada substância, ou seja, estimar o risco e dano celular que essa pode causar (VALADARES, 2006).

O teste da DL50 foi introduzido em 1927 por Trevan para avaliar substâncias que seriam utilizadas por seres humanos como por exemplo, a digitalis e a insulina. Ele tornou-se um teste fundamental para várias agências reguladoras responsáveis pela aprovação de novos fármacos, como a FDA (*Food and Drugs Administration*). Em 1981, a OECD (*Organization for Economic Cooperation and Development*) o incorporou em suas diretrizes (VALADARES, 2006). O objetivo desse teste é avaliar a mortalidade dos animais tratados, e estimar a dose letal para

50% desses animais. É realizado durante a avaliação de toxicidade aguda e determina as dosagens que deverão ser utilizadas posteriormente, no teste de toxicidade subaguda (OECD, 2008b).

A diretriz 401 da OECD, de 1981, estabeleceu as normas para os testes de toxicidade aguda, as doses eram escolhidas a partir de estudos anteriores para estimar o valor da DL50. Em 1987, a diretriz 401 foi revisada em relação às questões do bem-estar animal e os testes passaram a ser com animais de apenas um sexo e a dose limite foi reduzida para 2.000 mg/kg. Em 1996, surgiu o método da Toxicidade Aguda de Classe (TAC) descrito na OECD 423 e, em 1998, o Teste “Up and Down” (TUD), sendo recomendado na OECD 425. No método TUD, é estimado o valor da DL50, através do teste em animais de forma individual, com doses subsequentes, com a dose ajustada para menos ou mais, conforme o resultado prévio do animal anterior. As diretrizes 420, 423 e 425 da OECD foram definitivamente adotadas e recomendadas para avaliação da toxicidade, no ano 2000 (VALADARES, 2006).

Na toxicidade aguda os animais devem ser tratados e observados durante as primeiras 24 horas, durante 14 dias. A mortalidade será avaliada para que, desta forma, possa ser determinada a DL50 e as dosagens a serem testadas no teste de toxicidade subaguda. Os animais devem ser submetidos à eutanásia, no 15º dia, também devem ser feitas as análises macroscópicas e pesagem dos órgãos vitais. (OECD, 2008a).

Na toxicidade subaguda os animais são divididos em grupos tratados com diferentes doses, grupo controle negativo, grupo controle positivo e grupo satélite.

Devem ser observados diariamente, por 28 dias. Os animais serão submetidos à eutanásia, no 29º dia. Os órgãos vitais (coração, pulmões, fígado, rins, baço, ovário, útero e testículos) devem ser avaliados macroscopicamente, pesados e submetidos à corte histológico (OECD, 2008b).

Nos testes de toxicidade aguda e subaguda devem ser registrados os sinais tóxicos de caráter geral, bem como os dados fisiológicos (peso corporal, consumo de água e de ração) (OECD, 2008a). Deve ser feita análise sistemática do comportamento do animal testado, o *screening* hipocrático, que fornece informações sobre o nível de consciência, coordenação do sistema motor, reflexos e atividades sobre o sistema nervoso central e autônomo. Os parâmetros que devem ser avaliados são: frêmito vocal, irritabilidade, resposta ao toque, resposta ao aperto

da cauda, contorção, reflexos, tônus muscular, força para agarrar, ataxia, reflexo auricular, reflexo corneal, tremores, convulsões, straub, hipnose, anestesia, lacrimação, ptose, micção, defecação, piloereção, hipotermia, respiração e cianose (CUNHA, 2009). Também deve ser realizado análise dos parâmetros bioquímicos e hematológicos (COSTA, et al, 2012). A avaliação bioquímica consiste nos seguintes parâmetros: bilirrubina total, colesterol total e frações, triglicérides, glicose, eletrólitos (sódio, potássio e cálcio), marcadores de função hepática (alanina aminotransferase – ALT, aspartato aminotransferase – AST, gama glutamiltransferase e fosfatase alcalina), marcadores de função renal (ureia, creatinina e ácido úrico) e perfil proteico (albumina e proteína total). A avaliação hematológica consiste nos seguintes parâmetros: contagem diferencial de leucócitos, eritrócitos, plaquetas, níveis de hemoglobina, hematócrito e largura da distribuição dos glóbulos vermelhos (TRAESEL et al.,2015).

2.2.2 Teste de Micronúcleo e Ensaio Cometa

Os biomarcadores genéticos são muito úteis para revelar injúrias em células expostas a agentes tóxicos mutagênicos e com potencial carcinogênico. Dentre os principais marcadores de genotoxicidade e mutagenicidade, destacam-se o ensaio cometa e o teste de micronúcleo, pois expõem danos ao DNA (LUCIO, et al, 2018).

O teste de micronúcleo é utilizado para avaliar a formação dos cromossomos durante a fase mitótica, pois a célula que foi agredida por agentes tóxicos pode gerar danos visíveis divisão celular, que levam a formações de micronúcleos. Os MNs são estruturas formadas por fragmentos de cromossomos que foram removidos do núcleo principal, pois falharam na ligação ao fuso durante a divisão celular, formando corpúsculos extranucleares, excluídos do núcleo das células filhas. Sua ocorrência representa comprometimento genético causado pela exposição celular a agentes clastogênicos, mutagênicos e genotóxicos (LUCIO, et al, 2018). É o principal teste utilizado que serve como ferramenta de triagem para segurança de muitas substâncias e para classificar os agentes como cancerígenos ou não cancerígenos. A simplicidade na realização e execução desse teste, levou ao uso generalizado no mundo todo e a uma padronização para monitorar a toxicidade e segurança de agentes para uso na população (NAI, et al, 2015); (DE OLIVEI-

RA, CERQUEIRA, MEIRELES, 2016).

A eletroforese em gel de células individuais, sob condição neutra, foi desenvolvida por Ostling e Johansson para investigar danos no DNA e reparo de genotoxicidade induzida por radiação ionizante. O ensaio cometa é uma versão modificada desse método, utilizando eletroforese alcalina. O nome “ensaio do cometa” foi usado pela primeira vez por Olive e co-autores e desde então tem sido adotada. O ensaio cometa é um teste para avaliar a genotoxicidade, um método sensível e de baixo custo para medir danos no DNA, uma técnica para quantificação de danos aos cromossomos em células individuais. Consiste em gerar lise na membrana celular das células eucarióticas imersas em placas de agarose, e posteriormente executar a eletroforese em condições alcalinas ($\text{pH} > 13$) (MØLLER, 2022). Os fragmentos resultantes das quebras de fitas simples e duplas do DNA, que tem carga negativa, migram em direção ao polo positivo, o que ocasiona a aparência de um cometa, com cabeça e cauda. Sob as mesmas condições de ensaio, cometas com caudas maiores têm mais lesões de DNA do que cometas com caudas menores (LUCIO, et al, 2018).

Os experimentos de teste de micronúcleo e ensaio cometa são desenvolvidos concomitantemente com os animais tratados na toxicidade subaguda. Para o teste de micronúcleo, o sangue coletado deve ser submetido a esfregaço, corado por Giemsa e avaliado em objetiva de imersão. Para cada animal, são analisados 2000 eritrócitos policromáticos (OECD, 1997).

Para o ensaio cometa, as células dos animais são preparadas em lâminas com agarose, passadas por eletroforese, coradas e avaliadas em microscópio de fluorescência. São analisadas, aleatoriamente, cem células de cada animal. Estas células são classificadas de acordo com o tamanho da cauda em quatro classes: Classe 0 (sem dano); Classe 1 (dano pequeno); Classe 2 (dano médio) e Classe 3 (dano máximo) (OECD, 2014).

3 OBJETIVOS

GERAL

- Avaliar a toxicidade pré-clínica do extrato liofilizado das folhas da *C. sessiliflora* em ratos Wistar adultos.

ESPECÍFICOS

- Estimar a DL50 (dose letal para pelo menos 50% da população em estudo) da *C. sessiliflora* pelo teste de toxicidade aguda;
- Avaliar os parâmetros hematológicos, bioquímicos e histopatológicos, e de toxicidade sistêmica, nos animais tratados durante a toxicidade subaguda;
- Investigar o potencial genotóxico e mutagênico da *C. sessiliflora* em células de ratos Wistar pelo teste do micronúcleo e ensaio cometa.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BOAS, G.R.V. et al. Preclinical safety evaluation of the ethanolic extract from guavira fruits (*Campomanesia pubescens* (DC) O. BERG) in experimental models of acute and short-term toxicity in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 118, p. 1-12, 2018.

CARDOSO, C. R. P. Atividade mutagênica e ativadora da resposta imune celular induzidas por *Byrsonima crassa* Niedenzu e *Byrsonima intermedia* A. Juss. (Malpighiaceae). 2006.

CARDOSO, C. L; KATAOKA, VMF; RÉ-POPPI, N. Leaf oil of *Campomanesia sessiliflora* O. Berg. **Journal of Essential Oil Research**, v. 22, n. 4, p. 303-304, 2010.

CAMPOS, S. C. et al. Toxicidade de espécies vegetais. **Revista Brasileira de plantas medicinais**, v. 18, p. 373-382, 2016.

CATELAN, T. B. S. et al. Evaluation of the in vitro photoprotective potential of ethanolic extracts of four species of the genus *Campomanesia*. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 197, p. 111500, 2019.

COSTA, D. A. et al. Avaliação da toxicidade aguda e do efeito ansiolítico de um derivado sintético da carvona. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v. 16, n. 3, p. 303-310, 2012.

CRISPIM, B. A. et al. Development and characterization of microsatellite markers in *Campomanesia adamantium*, a native plant of the Cerrado ecoregions of South America. **Applications in Plant Sciences**, v. 7, n. 9, p. e11287, 2019.

CUNHA, L. C. et al. Avaliação da toxicidade aguda e subaguda, em ratos, do extrato etanólico das folhas e do látex de *Synadenium umbellatum* Pax. **Revista Brasileira de farmacognosia**, v. 19, n. 2A, p. 403-411, 2009.

DA SILVA PITTARELLI, B. F; MOURÃO, K. S. M; THADEO, M. Pericarp development in *Campomanesia Ruiz & Pav.* (Myrtaceae) species and systematic implications for the genus. **Flora**, v. 282, p. 151885, 2021.

DE CASTRO, T. L. A. et al. Ação antiproliferativa e mutagenicidade da infusão das folhas de *Campomanesia sessiliflora* no modelo de *Allium cepa*. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 7, p. e625974555-e625974555, 2020.

DE JESUS, G. S. et al. Antimicrobial Potential of Essential Oils from Cerrado Plants against Multidrug-Resistant Foodborne Microorganisms. **Molecules**, v. 25, n. 14, p. 3296, 2020.

DELPHAN, M. et al. Exercise protocols: The gap between preclinical and clinical exercise oncology studies. **Metabolism Open**, p. 100165, 2022.

DE OLIVEIRA, P. C; CERQUEIRA, E. M. M; MEIRELES, J. R. C. Avaliação de danos genéticos e apoptose em mulheres menopausadas que fazem uso da terapia de reposição hormonal. **Reprodução & Climatério**, v. 31, n. 3, p. 163-168, 2016.

DE OLIVEIRA RAPHAELLI, C. et al. Biological activity and chemical composition of fruits, seeds and leaves of guabirobeira (*Campomanesia xanthocarpa* O. Berg–Myrtaceae): a review. **Food Bioscience**, v. 40, p. 100899, 2021.

DOLL, R; PETO, R. The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, v. 66, n. 6, p. 1192-1308, 1981.

KATAOKA, V. M. F.; CARDOSO, C. A. L. Avaliação do perfil cromatográfico obtidos por CLAE-DAD e da atividade antioxidante das folhas de espécies *Campomanesia sessiliflora* (O. Berg) Mattos e *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 15, n. 1, p. 121-129, 2013.

LESCANO, C. H. et al. Polyphenols Present in *Campomanesia* Genus: Pharmacological and Nutraceutical Approach. In: **Polyphenols in Plants**. Academic Press, 2019. p. 407-420.

LIMA, D. F; GOLDENBERG, R; SOBRAL, M. O gênero *Campomanesia* (Myrtaceae) no estado do Paraná, Brasil. **Rodriguésia**, v. 62, n. 3, p. 683-693, 2011.

LUCIO, L. et al. Riscos ocupacionais, danos no material genético e estresse oxidativo frente à exposição aos resíduos de gases anestésicos. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 68, p. 33-41, 2018.

MØLLER, P. Measurement of oxidatively damaged DNA in mammalian cells using the comet assay: Reflections on validity, reliability and variability. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 873, p. 503423, 2022.

NAI, G. A. et al. Evaluation of genotoxicity induced by repetitive administration of local anaesthetics: an experimental study in rats. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 65, p. 21-26, 2015.

NEWMAN, D. J; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981– 2002. **Journal of natural products**, v. 66, n. 7, p. 1022-1037, 2003.

OECD – Organization for Economic Cooperation and Development (1997). **Guidelines for testing of chemical. Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test**. OECD (Ed.) Paris.

OECD – Organization for Economic Cooperation and Development (2008a). **Guidelines for testing of chemical. Acute oral toxicity - up-and-down-procedure**. OECD (Ed.) Paris.

OECD – Organization for Economic Cooperation and Development (2008b). **Guidelines for testing of chemical. Repeated dose 28-day oral toxicity study in rodents.** OECD (Ed.) Paris.

OECD – Organization for Economic Cooperation and Development (2014). **Guidelines for testing of chemical. In Vivo Mammalian Alkaline Comet Assay.** OECD (Ed.) Paris.

RAFFERTY, J. A. et al. Chemoprotection of normal tissues by transfer of drug resistance genes. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 15, n. 3, p. 365-383, 1996.

SÁ, S. et al. Phytochemistry and antimicrobial activity of *Campomanesia adamantium*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 28, p. 303-311, 2018.

SANGARAJU, D. et al. Establishment of baseline profiles of 50 bile acids in preclinical toxicity species: A comprehensive assessment of translational differences and study design considerations for biomarker development. **Toxicology and Applied Pharmacology**, p. 116008, 2022.

TRAESEL, G. K; CASTRO L.H.A; SILVA P.V.B; MUZZI R.M; KASSUYA C.A.L; ARENA A.C. et al. Assessment of the cytotoxic, genotoxic, and mutagenic potential of *Acrocomia aculeata* in rats. **Genetics And Molecular Research**. Ribeirão Preto: Funpec-editora, v.14, n. 1, p. 585-596, 2015.

VALADARES, M. C. Avaliação de toxicidade aguda: estratégias após a “era do teste dl50 “. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 3, n. 2, 2006.

VARANDA, E. A. Atividade mutagênica de plantas medicinais. **Revista de ciências farmacêuticas básica e aplicada**, v. 27, n. 1, 2006.

WFO (2022): *Campomanesia sessiliflora* (O.Berg) Mattos. Published on the Internet; <http://www.worldfloraonline.org/taxon/wfo-0000793990>. Accessed on: 2 Fev 2022.