

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

**Avaliação da toxicidade aguda e toxicogenética do extrato aquoso de
caules de *Aristolochia ridicula***

LAÍS CHANCARE GARCIA

Dourados-MS

2024

LAÍS CHANCARE GARCIA

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA, E TOXICOGENÉTICA DO EXTRATO
AQUOSO DE CAULES DE *ARISTOLOCHIA RIDICULA***

Dissertação de Mestrado 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.

Área do CNPQ: Toxicologia de Produtos Naturais. Ciências da Saúde:04.00.00.00-1.

Orientadora: Prof^a Dr^a Silvia Aparecida Oesterreich

Dourados-MS

2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

G216a Garcia, Laís Chancare

Avaliação da toxicidade aguda e toxicogenética do extrato aquoso de caules de Aristolochia
ridicula [recurso eletrônico] / Laís Chancare Garcia. -- 2024.

Arquivo em formato pdf.

Orientadora: Silvia Aparecida Oesterreich.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde)-Universidade Federal da Grande Dourados, 2024.

Disponível no Repositório Institucional da UFGD em:

<https://portal.ufgd.edu.br/setor/biblioteca/repositorio>

1. DL50. 2. ensaio cometa. 3. ensaio do micronúcleo. 4. toxidade aguda. 5. Aristolochia. 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 LAÍS CHANCARE GARCIA,
ALUNA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO
"FARMACOLOGIA".

Aos nove dias do mês de fevereiro do ano de dois mil e vinte e quatro, às quatorze horas, em sessão pública, realizou-se na Universidade Federal da Grande Dourados, a Defesa de Dissertação de Mestrado intitulada **"Avaliação da Toxicidade Aguda e Toxicogenética do extrato aquoso dos caules de Aristolochia Ridicula"**, apresentada pela mestranda Laís Chancare Garcia, do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, à Banca Examinadora constituída pelos membros: Prof.ª Dr.ª Sílvia Aparecida Oesterreich/UFGD (presidente/orientadora), Prof. Dr. Pablo Christiano Barboza Lollo/UFGD (membro titular interno), Prof.ª Dr.ª Karine de Cassia Freitas Gielow (membro titular externo). Iniciados os trabalhos, a presidência deu a conhecer à candidata 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. A 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, 09 de fevereiro de 2024.

Documento assinado digitalmente
SILVIA APARECIDA OESTERREICH
Data: 11/02/2024 15:30:21-0500
Verifique em: <https://validar.ufgd.br>

Prof.ª Dr.ª Sílvia Aparecida Oesterreich
Presidente/orientadora

Documento assinado digitalmente
PABLO CHRISTIANO BARBOZA LOLLO
Data: 11/02/2024 15:30:59-0300
Verifique em: <https://validar.ufgd.br>

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

Documento assinado digitalmente
KARINE DE CASSIA FREITAS GIELOW
Data: 09/02/2024 14:43:30-0500
Verifique em: <https://validar.ufgd.br>

Prof.ª Dr.ª Karine de Cassia Freitas Gielow
Membro Titular Externo
(Participação Remota)

(PARA USO EXCLUSIVO DA PROPP)

ATA HOMOLOGADA EM: __/__/__, PELA PROPP/UFGD.

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho à Deus, meu
esposo João Francisco e meus filhos
Maya e Joao Pedro.

Vocês foram a minha motivação
durante essa caminhada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, pelo dom da vida, pela saúde e por ter me dado sabedoria para enfrentar todos os desafios até aqui. Aos meus pais, Orlei (*in memoriam*). Pai, saiba que eu carrego comigo todo o seu esforço e conselhos para eu nunca desistir dos estudos e dos meus sonhos. Minha mãe Nádia, por todo amor, dedicação e ajuda em todos esses anos. As minhas irmãs, Aline e Anne Beatriz, pelo companheirismo de todas as horas, pelo colo quando precisava e por cuidarem do João Pedro e da Maya para que meus estudos fossem uma realidade.

Aos meus filhos João Pedro e Maya, sem vocês eu não teria forças para continuar. Vocês me motivam a ser melhor, aprender mais e ir à luta. Vocês são a razão de tudo!

Ao meu esposo, João Francisco, por todo seu carinho e pela compreensão, apoio psicológico e financeiro, crucial para essa realização desse sonho!

Às minhas amigas, que direta ou indiretamente, me incentivaram e tornaram a trajetória mais leve. Minha gratidão eterna!

Ao meus amigos Lucas e Anielly, que me estenderam a mão e me deram auxílio, sem exitar com extrema competência e carinho. Minha eterna gratidão!

À Larissa, que tanto me ensinou nesses quase três anos. Lari, que Deus te retribua tudo o que fez por mim. Obrigada pelas cias diárias, cafés etc... está guardado em meu coração!

Aos colegas do Grupo de Pesquisa Biologia Aplicada à Saúde: Dioelen, Lavínia, Junior, Anahy e Jacenir, Gugu. Obrigada por toda parceria, ajuda e aprendizado. Estar ao lado de vocês foi um privilégio. Além dos alunos de Iniciação científica Altair, Vinicio, Thaís e Tainá e demais alunos que me acompanharam nessa pesquisa. Fico muito feliz e grata por ter contribuído na formação acadêmica de vocês, e ter aprendido com cada um sobre coisas impagáveis da vida. Nunca vou esquecê-los. Muito obrigada por tudo!

À professora Fernanda Seixas, que desde a minha graduação em Nutrição incentivou minha jornada acadêmica. Foi crucial para chegar até aqui. Agradeço por tudo que aprendi!

Ao professor Claudio Nogueira, por toda troca de conhecimentos e aprendizados durante a pesquisa. Agradeço por todo seu carinho, consideração e apoio.

À professora Silvia Aparecida Oesterreich, minha orientadora, que me acompanha desde a graduação, certo dia me convidou a ingressar na iniciação científica e desde então, depositou confiança e sempre acreditou no meu potencial. Serei eternamente grata, professora!

À agência de fomento CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior do Ministério da Educação) pela oportunidade e apoio durante o mestrado.

EPÍGRAFE

E aprendi que se depende sempre de tanta, muita, diferente gente. Toda pessoa sempre é as marcas das lições diárias de outras tantas pessoas.

(Gonzaguinha)

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –Visão geral da <i>Aristolochia ridicula</i>	16
Figura 2 – Formação de eritrótrócitos policromáticos (PCE) e eritrócitos normocromáticos (NCE)	22
Figura 3 – Eritrócito policromático com micronúcleo (a) Eritrócito policromático sem núcleo (b) e eritrócito normocromático sem micronúcleo (c)	23
Figura 4 – Esquematização das células submetidas ao ensaio cometa	25
Figura 5 — Escala de dano no ensaio cometa	25

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<i>A.taliscana</i>	<i>Aristolochia taliscana</i>
<i>A acuminata</i>	<i>Aristolochia acuminata</i>
<i>A.brasiliensis</i>	<i>Aristolochia brasiliensis</i>
<i>A. cymbifera</i>	<i>Aristolochia cymbifera</i>
<i>A. esperanzae</i>	<i>Aristolochia esperanzae</i>
<i>A. gilbertii</i>	<i>Aristolochia gilbertii</i>
<i>A. labiata</i>	<i>Aristolochia labiata</i>
<i>A. ridicula</i>	<i>Aristolochia ridicula</i>
<i>A. tagala</i>	<i>Aristolochia tagala</i>
<i>A. triangularis</i>	<i>Aristolochia triangularis</i>
AA	Ácido Aristolóquico
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EAAR	Extrato Aquoso de <i>Aristolochia</i>
ERN	Espécies Reativas de Hidrogênio
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
FDA	Food and Drug Administration
MN	Microcúleo
NCEs	Eritrócitos Normocromáticos
NOAEL	Dose de Efeito Adverso Não Observado
NOEL	Dose de Efeito Não Observado
OECD	<i>Organisation for Economic Co-operation and Development</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCEs	Eritrócito Policromático
pH	Potencial Hidrogeniônico
PICs	Práticas Integrativas e Complementares
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RNA	Ácido Ribonucleico
SCGE	<i>Single cell gel electrophoresis</i>
SUS	Sistema Único de Saúde

Avaliação da toxicidade aguda e toxicogenética do extrato aquoso de caules de *Aristolochia ridicula*

RESUMO

O uso de plantas medicinais é reconhecido desde a antiguidade e tem ganhado destaque no cenário mundial, tendo seu uso incentivado pela Organização Mundial de Saúde (OMS). A *Aristolochia ridicula* pertencente a família Aristolochiaceae e a ordem Piperales que é constituída por aproximadamente 600 espécies. A maioria das espécies do gênero *Aristolochia* ocorrem em borda de matas brasileiras e são conhecidas popularmente por “cipó-de-mil homens”, “patinho”, “jarrinha”, “erva-de-urubu” entre outros. O uso da planta está associado a sua composição química e possíveis propriedades terapêuticas como antidiarreicas, antiespasmóticas, ligadas ao tratamento de câncer, emagrecimento e inflamações. Apesar das propriedades da planta, não existem registros no Brasil de estudos que validem seu uso seguro. Os estudos de toxicidade e genotoxicidade são necessários para avaliar os possíveis efeitos adversos, garantindo a segurança para o uso de uma planta medicinal. O objetivo da pesquisa foi avaliar a toxicidade aguda, potencial genotóxico e mutagênico do extrato aquoso dos caules de *Aristolochia ridicula*. Para o teste de toxicidade aguda, dez ratos *Wistar* (n= 10) sendo cinco machos e cinco fêmeas, foram tratados via oral com dose única de 2000 mg/kg de peso do extrato aquoso, sendo observadas e avaliadas de acordo com o screening hipocrático durante 14 dias. No 15º dia os animais foram submetidos à eutanásia e realizada coleta dos órgãos vitais para análise macroscópica. Além dos ensaios de genotoxicidade, onde 10 ratos de ambos os sexos (n= 10; cinco de cada sexo) foram tratados com a dose 2000mg/kg do extrato. O potencial genotóxico foi avaliado de acordo com o teste do micronúcleo e o ensaio de cometa. Análise estatística feita através dos testes ANOVA, seguido do pós teste de Tukey com $p < 0,05$. O extrato aquoso dos caules de *A. ridicula* não é tóxico na dose de 2000mg/kg e não apresenta efeitos genotóxicos e mutagênicos nas condições experimentais analisadas.

Palavras-chave: DL50, ensaio cometa, ensaio do micronúcleo, toxicidade aguda, *Aristolochia*.

Evaluation of acute toxicity, and toxicogenetics of the aqueous extract of stems of *Aristolochia ridicula*

ABSTRACT

The use of medicinal plants has been recognized since ancient times and is currently gaining prominence on the world stage. Its use is encouraged by the World Health Organization (WHO). *Aristolochia ridicula* belongs to the Aristolochiaceae family and the Piperales order, which consists of approximately 600 species. Most of the species in the *Aristolochia* group occur on the edge of Brazilian forests. They are popularly known as “cipó-de-thousand-men”, “patinho”, “jarrinha” or “erva-de-urubu” among others. The use of the plant is associated with its chemical composition and possible therapeutic properties, such as antidiarrheal and antispasmodic, linked to cancer treatment, weight loss, and inflammation. Despite the plant's properties, no records of studies in Brazil validate its safe use. Toxicity and genotoxicity studies are necessary to evaluate possible adverse effects and ensure the safety of using a medicinal plant. The research aimed to evaluate the acute toxicity, genotoxic, and mutagenic potential of the aqueous extract of *Aristolochia ridicula* stems. For the acute toxicity test, ten Wistar rats (n= 10), five males and five females, were treated orally with a single dose of 2000 mg/kg of weight of the aqueous extract, being observed and evaluated according to Hippocratic screening, for 14 days. On the 15th day, the animals were euthanized, and vital organs were collected for macroscopic analysis. In addition to the genotoxicity tests, 10 rats of both sexes (n= 10; five of each sex) were treated with a dose of 2000mg/kg of the extract. The genotoxic potential was evaluated using the micronucleus test and the comet assay. Statistical analysis was carried out using ANOVA Tukey tests with $p < 0.05$. The aqueous extract of *A. ridicula* stems is not toxic at a dose of 2000 mg/kg and does not present genotoxic and mutagenic effects under the experimental conditions demonstrated.

Keywords: Assay micronucleus, comet assay, acute toxicity, *Aristolochia ridicula*.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	11
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	13
2.1 Plantas Medicinais.....	13
2.2 Família Aristolochiaceae e o gênero <i>Aristolochia</i>	14
2.2.1 Espécie <i>Aristolochia ridicula</i>	15
2.2.2 Composição Química.....	16
2.3 Compostos Antioxidantes.....	17
2.4 Ensaios pré clínicos.....	18
2.4.1 Estudos de toxicidade.....	18
2.4.1.1 Toxicidade Aguda.....	19
2.4.2 Estudos de genotoxicidade.....	20
2.4.2.1 Modelos para estudos genotóxicos.....	21
2.4.2.2 Teste do micronúcleo.....	22
2.4.2.3 Ensaio do cometa- SCGE.....	24
3 OBJETIVOS.....	27
4 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	28
5 APÊNDICES.....	38
5.1 Artigo I : From folk knowledge to science: an overview of studies on the genus <i>Aristolochia</i> (2013-2023).....	39
5.2 Artigo II: Evaluation of the Acute Toxicity and Toxicogenetic Effects of the Aqueous Extract from the Stems of <i>Aristolochia ridicula</i>	51
6 ANEXOS.....	69
6.1 Aprovação do Comitê de ética (CEUA)	69
6.2 Cadastro da planta no Sistema Nacional de Gestão do patrimônio genético e do conhecimento tradicional associado (SISGEN)	70
6.3 Comprovante de Submissão Artigo I	70

1. INTRODUÇÃO

A utilização de plantas com fins medicinais é uma prática conhecida desde a antiguidade e que tem ganhado cada vez mais interesse e reconhecimento, à medida que as pessoas procuram formas mais naturais e alternativas de cuidados de saúde. Essa tendência reflete a busca por abordagens de prevenção de doenças e promoção da saúde, além da valorização da cultura de grupos e comunidades, pois ao longo da história, o uso de plantas medicinais se relaciona com práticas e tradições culturais (Maciel *et al.*, 2002; Kar *et al.*, 2022). Além disso, produtos com fins terapêuticos provenientes de plantas têm sido vistos como uma área promissora da ciência farmacêutica (Castro e Albiero 2016; Alves 2013).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) define como planta medicinal “todo e qualquer vegetal que possui em um ou mais órgãos, substâncias que podem ser utilizadas com fins terapêuticos ou que sejam precursores de fármacos “semissintéticos” (OMS, 2006).

Nesse sentido, as plantas medicinais tornam-se uma alternativa para o tratamento de diversos problemas de saúde, uma vez que cresce a busca por alternativas naturais aos tratamentos convencionais, que podem ser utilizadas em forma de infusos, extratos, óleos, xaropes, entre outros (Heinrich *et al.*, 2009).

O Brasil é conhecido e reconhecido por sua extraordinária biodiversidade vegetal, sendo considerado um dos países mais ricos em variedade de espécies de plantas. Essa riqueza biológica fornece uma enorme gama de substâncias biologicamente ativas que possuem potencial para aplicações farmacológicas e terapêuticas (Castro e Figueiredo, 2020). Por consequência, o uso de plantas medicinais tem ganhado reconhecimento no campo da medicina baseada em evidências, com estudos científicos que visam validar o uso, explorar seus mecanismos de ação e viabilizar o uso como medicamentos fitoterápicos em detrimento dos medicamentos convencionais, considerando a sua ampla aplicabilidade terapêutica e fácil acesso à população (Silva *et al.*, 2021).

Grande parte da população faz uso de plantas medicinais de maneira empírica e aleatória, ou seja, baseado no conhecimento local transferido pela própria comunidade. A prática decorre de diversos fatores como o fácil acesso, baixo custo e crenças que são repassadas entre gerações. Portanto, torna-se relevante o estudo dos compostos bioativos de plantas medicinais consumidas no Brasil, seus efeitos farmacológicos e possível toxicidade (Maciel, 2002; Oliveira e Gonçalves, 2006).

A *Aristolochia ridícula*, é uma planta que pertence à família *Aristolochiaceae* e a

ordem Piperales que é constituída por aproximadamente 600 espécies, dispersas nas zonas temperadas e predominantemente nos trópicos. A maioria das espécies do grupo *Aristolochia* ocorrem em borda de matas brasileiras e são conhecidas popularmente por “cipó-de-mil homens”, “cipó milomem”, “patinho”, “papo -de-Peru”, “jarrinha”, “erva-de-urubu” entre outros (Sibbr, 2021).

O uso terapêutico de várias espécies desta família incluindo a *Aristolochia ridicula* atribui-se à sua composição química característica, com presença de compostos fenólicos, flavonoides, bi flavonas, chalconaflavonas e tetra flavonoides que são encontrados na planta (Machado; Lopes, 2008; Salomé, *et al* 2020; Navickiene; Lopes, 2001;). Espécies do gênero tem se destacado por apresentarem propriedades biológicas ligadas ao tratamento de câncer (Heinrich *et al.*, 2009); atividades farmacológicas antibacterianas (Alviano *et al.*, 2008; León-Díaz *et al.*, 2010); inseticida, antidiarreica, digestiva e tratamento de picada de cobras (Frei *et al*, 1985; Rodríguez, 2010); anti- inflamatórias, antirreumáticas e antiespasmódico (Messiano *et al.*, 2008), além de serem utilizadas no tratamento de inflamações pulmonares e em terapias de emagrecimento (Oliveira & Gonçalves, 2019).

Machado e Lopes (2008) em estudos químicos experimentais com folhas de *A. Ridicula*, encontraram três novos flavonoides, sendo uma bi flavona, uma nova chalconaflavona e tetra flavonoide, um grande grupo de metabólitos pertencente a família dos flavonoides, estes considerados compostos raros.

Uma vez que a ocorrência desse composto é atípico, torna esta planta ainda mais promissora no âmbito da ciência farmacológica. No entanto, estudos pregressos mostram que a mesma pode apresentar ações de citotoxicidade, ligadas principalmente ao ácido aristolóquico, descrito em plantas do gênero e, responsável por apresentar indução de nefropatia e câncer em humanos (Kang *et al.*, 2021; Han *et al.*, 2019).

O uso de *Aristolochia ridicula*, no Brasil com fins medicinais é referido principalmente nos estados Rio Grande do Sul, Paraná, Santa Catarina e Mato Grosso do Sul, onde são utilizados como aromatizante de chimarrão e para fins terapêuticos (Epagri, 2011;

Nascimento *et al.*, 2010). Entretanto, ainda carecem estudos à seu respeito, tanto de toxicidade clínica quanto de genética toxicológica, que possam validar o uso seguro da mesma.

Desta forma, o objetivo da pesquisa foi avaliar a toxicidade aguda, potencial toxicogenético do extrato aquoso dos caules de *Aristolochia ridicula* em ratos Wistar.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Plantas Medicinais

O uso de plantas medicinais acompanha a história da humanidade, como estratégia terapêutica para cura, tratamento e prevenção de doenças e a biodiversidade vegetal segue exercendo importância e influência no âmbito da saúde (Almeida, 2011; Samanta *et al.*, 2014). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), cerca de 80% da população mundial faz uso de plantas medicinais a fim de sanar problemas de saúde, seja como recurso primário ou secundário (OMS, 1998).

No Brasil, o uso de plantas medicinais como alternativa terapêutica reflete a influência dos fatores econômicos, culturais e em alguns locais, representa o único recurso terapêutico para determinados grupos e comunidades (Santos, 2000). Por consequência, algumas pessoas têm ideia equivocada sobre o assunto, acreditando que “se é natural, não faz mal”, o que muitas vezes não é verdadeiro (Argenta *et al.*, 2011; Mauad, 2016). Desse modo, a população que faz o uso de plantas medicinais adquirem suas informações de eficácia com base no conhecimento popular. Entretanto, apenas o uso e o conhecimento popular não são suficientes para validar o consumo seguro e a eficácia de determinada planta, sendo fundamental que as evidências científicas comprovem tais benefícios e riscos à saúde (OMS 1978; Maciel *et al.*, 2002).

Segundo Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), planta medicinal pode ser definida como toda e qualquer espécie de origem vegetal, seja esta cultivada ou não, utilizada para fins terapêuticos (Brasil, 2014). Ainda, segundo a ANVISA esse consumo pode ser feito de maneira tradicional ou através do uso fitoterápico, que conforme a RDC nº 26 (13/05/2014) se dá por meio de matérias primas ativas de vegetais, exceto as substâncias ativas isoladas, com finalidade curativa, profilática ou paliativa, incluindo os medicamentos fitoterápicos, sendo eles simples ou compostos (Brasil, 2014).

A pesquisa etnofarmacológica é relativamente recente no âmbito da ciência, envolvendo plantas medicinais. Bruhn & Holmstedt em 1981 descreveram o termo etnofarmacologia, como “Conhecimento multidisciplinar de agentes biologicamente ativos, observados e estudados pelo homem”. Ou seja, envolvendo a relação aos agentes farmacologicamente ativos com a cultura e história com informações coletadas dentro de uma determinada população. A partir disso, as informações demandadas de estudos etnofarmacológicos podem servir como ponto de partida para o delineamento experimental de plantas que possam desempenhar potencial farmacológico

(Almeida *et al.*, 2020). Portanto, para um medicamento ser considerado fitoterápico, o mesmo deve ser obtido por meio de matérias-primas ativas de vegetais ou plantas medicinais e são liberados para consumo a partir do conhecimento pleno de sua eficácia e riscos, incluindo estudos etnofarmacológicos, ensaios clínicos técnico-científicos entre outras exigências regulatórias (Brasil, 2008; Carneiro *et al.*, 2014; Maciel *et al.*, 2002).

O Brasil dispõe de ampla biodiversidade vegetal com potencial farmacológico, e avanços nas pesquisas científicas, bem como nas práticas integrativas devem ser encorajadas a fim de apoiar terapêuticas seguras à população (Demartelaere *et al.*, 2022). Em vista disso, o Ministério da Saúde do Brasil reconhece o uso de plantas medicinais, implementando como parte da Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PICs) no Sistema Único de Saúde (SUS). Tais ações visam integrar as terapias tradicionais e complementares à medicina convencional (Brasil, 2006; Lima *et al.*, 2014; Santos, 2011). Em vista disso, desde 2019 está em vigor a 6ª edição da farmacopeia brasileira, que dispõe sobre a utilização de plantas medicinais, e informações sobre o controle de qualidade, além de contribuir com apoio técnico para a elaboração e produção de novos medicamentos (Brasil, 2019).

Portanto, para que uma planta medicinal seja considerada segura ou para fins de produção de medicamentos fitoterápicos, diversos pontos que devem ser considerados, desde as escolhas embasadas no saber popular aos estudos etnofarmacológicos, além de estudos de toxicidade (ANVISA, 2010; Colet *et al.*, 2015; Pedroso *et al.*, 2021).

2.2 Família Aristolochiaceae e o gênero Aristolochia

O grupo Aristolochiaceae é uma família de plantas angiospermas. Esta família é conhecida pelo nome comum de *Aristolochia* e inclui diversas espécies de plantas que podem ser encontradas em várias partes do mundo, principalmente em climas tropicais e subtropicais, incluindo o Brasil (Epagri, 2011; Nascimento *et al.*, 2010).

São consideradas ervas perenes, trepadeiras, arbustos ou pequenas árvores. Elas podem ser reconhecidas por suas flores peculiares, que muitas vezes têm uma forma tubular ou em forma de funil. As folhas podem ser alternas ou opostas e variam em forma e tamanho. São plantas conhecidas popularmente como jarriinha, aristolóquia, papo-de-peru, cassaú, cipó mil-homens ou cipó-milome, serpentaria, patito, cipó-mata-cobra, angelicó entre outros (Nascimento *et al.*, 2010; Rodríguez, 2010).

O gênero *Aristolochia* está representado na flora brasileira por cerca de 100 espécies distintas (Berjano *et al.*, 2009), dentre as mais de 500 espécies que são encontradas em várias partes do mundo, principalmente em regiões tropicais e subtropicais (Freitas, *et al.*, 2020; Fernandes *et al.*, 2022).

As flores de muitas espécies de *Aristolochia* exalam cheiros característicos e desagradável, que se assemelham a carne em putrefação. Outras possuem aromas mais agradáveis que remetem o aroma de limão ou citronela (Erbar *et al.*, 2017; Hipólito *et al.*, 2012). A importância das espécies do gênero no Brasil está relacionada, principalmente, ao uso medicinal e ornamental (Fernandes *et al.*, 2021). Dentre as espécies utilizadas como medicinal no país, se destacam: *Aristolochia arcuata*, *A. cymbifera*, *A. esperanzae*, *A. gigantea*, *A. triangularis*, *A. labiata*, *A. brasiliensis*, *A. gilbertti*, e *A. ridicula* (Freitas *et al.*, 2020; Neto;Gomes, 2018; Nogueira *et al.*, 2013).

A quantidade e variedade de compostos obtidos a partir dos estudos fitoquímicos direcionados às espécies de *Aristolochia* contribui tanto para compreensão do gênero, como para novos achados farmacológicos (Mueller *et al.*, 2022). Neste sentido, estudos mais precisos são relevantes, uma vez que os achados na literatura são insuficientes principalmente sobre a composição e comportamento de grande parte das espécies consumidas no Brasil, incluindo a *A. ridicula* (Soares *et al.*, 2022).

2.2.1 Espécie *Aristolochia ridicula*

A *Aristolochia ridicula* pertence ao gênero *Aristolochia*, sendo uma planta de característica trepadeira, perene, que produz flores peculiares e distintas. Suas flores têm uma forma tubular alongada e são frequentemente chamadas de "flores- pipe" ou "flores- cachimbo" devido à sua semelhança com um cachimbo ou uma urna. As flores geralmente têm uma coloração marrom ou roxa e são adornadas com padrões intrincados, com caule decasca grossa, estriado e rugoso e as folhas em formato que se assemelham a forma de coração (Sibbr,2021).

Nativa de algumas regiões da América do Sul, incluindo o Brasil, além de países vizinhos. Pode ser encontrada em áreas de floresta tropical e muitas vezes crescendo como uma planta trepadeira em árvores ou arbustos, bordas de matas e estradas (Lorenzi e Matos, 2002). Nas últimas décadas, tem sido crescente os estudos que visam entender os mecanismos de ação de compostos tóxicos presentes nas espécies de *Aristolochia*, incluindo *A. ridicula* (Fernandes,2021; Lopes *et al.*, 2001). Estudos experimentais mostraram uma composição rara presente nos caules e folhas de *A. ridicula* (Machado, 2008) apontando-a como fonte de

antioxidantes e compostos fenólicos. Contudo embora a planta apresente compostos bioativos, a mesma pode ter efeitos tóxicos, citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos causados pela utilização de forma indiscriminada, sem uma prática segura e fundamentada (Moura *et al.*, 2020).

Considerando a escassez de estudos na literatura envolvendo a espécie *A. ridicula*, e diante dos possíveis efeitos relacionados a mesma, torna essa planta uma forte candidata a novos estudos, principalmente quanto sua atividade biológica e possível toxicidade.

1 — Visão geral da *Aristolochia ridicula*.



Fonte: Arquivo pessoal Claudio Nogueira; (Horto UFGD).

2.2.2 Composição Química

Com relação aos compostos bioativos de plantas do genero 18 espécies de *Aristolochia* já foram identificadas quanto à sua composição química (Kuo *et al.*, 2012). Dentre os compostos encontrados estão um grande número de metabólitos secundários, incluindo mais de 16 grupos químicos como: os ácidos aristolóquios e seus derivados, alcaloides, cumarinas, flavonoides, esteroides, ácidos aristolóquicos, quinolinas, terpenoides, lignanas e flavonoides (Carneiro *et al.*, 2000; Kuo *et al.*, 2012 Machado, 2008; Paulert *et al.*, 2017; Wu *et al.*, 2005). Em estudo

recente, Mueller *et al.* (2022) citaram 16 atividades biológicas ativas em plantas do mesmo gênero. Os principais achados envolvendo *Aristolochia* revelam a presença de compostos antioxidantes, incluindo alguns compostos raros como é o caso da *A. ridicula*.

Embora esses compostos demonstrem bioatividade, o ácido aristolóquio (AA) é um composto aromático contendo nitrogênio, basicamente insolúvel em água, levemente ácido, que não pertence à classe dos alcaloides nem dos glicosídeos, e está presente na maioria das espécies de *Aristolochia* (Frei *et al.*, 1985; Han 2019; Wu *et al.*, 2005.a). Os AA de forma geral, tem características negativas, principalmente por causarem nefrotoxicidade e mutagenicidade e serem considerados cancerígenos (Chen *et al.*, 2007; Kohara *et al.*, 2002). Entretanto, a literatura relata que dependendo do modo de extração e preparo da solução pode haver maior ou menor concentrações de AA (Chen, 2007; Wiebrecht, 2011; Wu *et al.*, 2005.b). Além disso, há confronto na literatura sobre os efeitos dos AA em humanos, carecendo maiores estudos sobre o tema (Zhou *et al.* 2019). A relação dose-resposta ainda não está totalmente elucidada na literatura no que se diz respeito ao AA, seja pela dose máxima a ser considerada tóxica, ou parte da planta que é utilizada. Além disso, o tempo de consumo seja numa fração de dose alta e única ou dose baixa repetidamente, podem levar a reações tóxicas diferentes (Faria *et al.*, 2021)

2.2.3 Compostos Antioxidantes

Para haver homeostase no organismo é necessário que haja processos oxidativos, a fim de manter a função do metabolismo celular e oxidação de compostos orgânicos (Comhair; Erzurum, 2002). Esse processo por vez, geram espécies reativas de oxigênio (ERO) e de nitrogênio (ERN) presente em diversas condições fisiológicas, que quando são produzidas em excesso afetam a regulação celular (Vasconcelos *et al.*, 2007; Pisoschi *et al.*, 2016). Por outro lado, o organismo humano dispõe de um sistema antioxidante eficiente, controlando e estabelecendo o equilíbrio causado pela produção de radicais livres (Amoso *et al.*, 2019).

Os compostos fenólicos fazem parte de um grupo de antioxidantes que a partir de uma molécula simples de fenol, gera substâncias diferentes de graus e de utilidades biológicas (PISOSCHI *et al.*, 2016). Além disso, a concentração desses compostos pode ser influenciada por diversos fatores, incluindo espécie vegetal, estação do ano, condições de cultivo, de solo, armazenamento, entre outros (Abe *et al.*, 2007; Gobbo-Neto; Lopes 2007). Desempenham dentre as suas características biológicas, atividade antimicrobiana, anti-inflamatória e antioxidante (Soares, 2002).

Por sua vez, os flavonoides englobam um grupo de compostos fenólicos presente nas frutas e nos vegetais, sob diversas variações, como flavonois, isoflavonas, chalconas, flavonas, flavononas, catequinas e antocianinas, capazes de desempenhar ligação entre as suas propriedades sequestradoras e quelantes de radicais livres, podendo agir na formação do radical livre em si (Silva *et al.* 2010). Estudos sugerem que os antioxidantes naturais atuam como principais fontes ligadas a propriedades antimutagênicas, inferindo na prevenção de espécies reativas de oxigênio (ERO) antes que a interação substância/DNA causem uma mutação (Dantas, 2019; Słoczyńska *et al.*, 2014).

Machado (2005), em seus estudos sobre aristolochias, confirmou a presença desses compostos em extratos do caule de *Aristolochia ridicula*, entre eles: quatro biflavonas e quatro chalconas-flavonas, além de bi e tetra flavonoides, flavonois, diidroflavonois e isoflavonois, presente na espécie. Já Lopes *et al.*, (2001) consideraram rica em antioxidantes e compostos bioativos.

2.3 Ensaios Pré Clínicos

2.3.1 Estudos de Toxicidade

A toxicidade pode ser definida como a capacidade de uma substância, em determinada condição, causar algum tipo de dano sobre o organismo, devido às suas propriedades químicas e à sua concentração (Silva, 2021; Fonseca *et al.*, 2008). Produtos de origem natural tem ganhado espaço dentro da indústria farmacêutica, junto as técnicas relativas à pesquisa de moléculas análogas àquelas presentes em produtos naturais ou derivadas de compostos químicos, foco central em pesquisas na medicina moderna (Viegas *et al.*, 2006). No entanto, há evidências quanto ao perfil tóxico de plantas medicinais no organismo (Dirir *et al.*, 2017; Campos *et al.*, 2016). Neste sentido, os ensaios de toxicidade tem como finalidade determinar dos efeitos adversos induzidos pela interação entre substâncias químicas e sistemas biológicos (Abudayyak *et al.*, 2015; Moura *et al.*, 2012).

Ensaios de toxicidade pré-clínica são necessários para identificar uma dose inicial segura para estudos posteriores. Além de permitir maior embasamento científico diante dos possíveis efeitos colaterais sob doses altas de determinada substância teste (Moura *et al.*, 2012; Brasil, 2013).

Os ensaios toxicológicos podem ser *in vitro* ou *in vivo*, ainda podendo ser classificado com agudo, subagudo, subcrônico e crônico, onde se diferem sob o tempo em que são expostos

à substância teste e seu potencial tóxico (Denny;Stewart, 2013).

O “Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos”, publicado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA (2013), dispõe as normativas para realização de estudos de toxicidade aguda, subaguda, genotoxicidade, carcinogenicidade e tolerância local, assim como ensaios inerentes a toxicocinética. No Brasil, a ANVISA é quem regulamenta as normas regulatórias juntamente com demais órgãos reguladores, como a Organização Mundial de Saúde (OMS) que dispõem de protocolos de análise toxicológica, seguindo as diretrizes da *Organization for Economic Co-operation and Development* (Oecd, 2008), que detalha os protocolos mais utilizados na literatura, que são os de toxicidade aguda, subaguda e os estudos de genotoxicidade. Tais protocolos são fundamentais para estudos envolvendo plantas medicinais (Hasenclever *et al.*, 2017). Neste sentido, os ensaios de toxicidade compreendem testes com exposições a doses de substâncias. E, por meio deles, torna-se possível constatar órgãos alvos, efeitos fisiológicos, bioquímicos, hematológicos, histopatológicos e anatômicos, bem como, informações a respeito da dose de efeito não observado (NOEL) e dose de efeito adverso não observado (NOAEL) (ANVISA 2013).

2.3.1.1 Toxicidade Aguda

A toxicidade aguda é um teste preliminar na área de toxicologia clínica reconhecido por conseguir avaliar substâncias destinadas ao consumo humano. Esse teste vem sendo cada vez mais utilizado na comparação e classificação da toxicidade de substâncias, além de ser um pré-requisito definido por agências regulatórias tais como a *Food and Drug Administration* (FDA) e a OECD (Silva, 2021).

O teste de toxicidade aguda é atualmente regulamentado pela diretriz 425 da OECD, que por sua vez investiga através de uma administração de dose única ou de múltiplas doses, em um período de 24h. São realizadas observações diárias pelo período de 14 dias após o início do teste afim de observar efeitos adversos que ocorrem neste período. Desta forma, definir a dose letal oral mediana (DL50), expressa por miligramas por quilo de peso corporal (mg/kg) e, estatisticamente, representa a dose única capaz de levar a óbito 50% dos animais submetidos ao teste de substância oral (Oecd,2008).

Para realização do teste os animais devem estar em jejum, serem pesados previamente, logo após a dose da substância deve ser administrada de acordo com o peso de cada animal, via gavagem. A dose limite adotada deve estar entre 2000mg/kg ou 5000mg/kg, sendo dividido em

grupos de 5 animais com idade entre 8-12 semanas, preferencialmente ratas fêmeas nulíparas e não prenhas (Oecd, 2008).

Após a administração, os animais deverão ser observados nos primeiros trinta minutos, com especial atenção às quatro horas seguintes e, depois, durante uma vez ao dia no mínimo, até o fim dos 14 dias de estudo. Esses parâmetros fazem parte de uma avaliação observacional conhecida como *screening* hipocrático, desenvolvida por Malone e Robichaud (1962), que permite detectar a presença ou ausência de sintomas em animais tratados durante a exposição à determinada substância teste sobre os parâmetros: estado de consciência e disposição (I), atividade e coordenação do sistema motor (II), reflexos (III), atividades do sistema nervoso central (IV) e sistema nervoso autônomo (V) (Oecd, 2008).

Os animais que vierem à óbito durante o período de estudo devido à exposição à substância alvo, devem passar por criteriosa biópsia. Após a eutanásia, caso seja confirmada alguma alteração macroscópica no (s) órgão (s), uma análise histopatológica deverá ser realizada e reportada como uma informação relevante ao estudo (Oecd, 2008).

2.3.2 Estudos de genotoxicidade

O termo genotóxico refere-se à capacidade de substâncias químicas, radiações ou agentes ambientais causarem danos ao material genético de um organismo, alterando o DNA e os cromossomos. Esses danos podem culminar em mutações, que são alterações permanentes na sequência de DNA, que podem implicar em problemas para a saúde, como o desenvolvimento de câncer ou outras doenças genéticas (Vogel, 1989).

Os causadores de danos no DNA e nos cromossomos podem ser classificados em duas classes, sendo chamados de agentes mutagênicos e genotóxicos (Hara *et al.*, 2018). Os agentes genotóxicos podem agir de maneiras diferentes, alguns podem causar danos diretos ao DNA, produzindo alterações em sua estrutura ou função, enquanto outros interferem nos mecanismos celulares responsáveis pela replicação e reparo do DNA (Knaapen *et al.*, 2006).

Todos os seres vivos, ao longo da vida podem estar sujeito a mutações e esses mecanismos fazem parte da evolução de uma espécie (Jablonka; Lamb, 2010). Entretanto, as mutações podem advir de origem natural, chamadas de espontâneas ou de maneira induzida, ou seja, quando surgem após uma exposição à determinada substância (Düsman *et al.*, 2012). Portanto, em toxicologia, qualquer situação de alteração no DNA ou RNA que afete o gene de forma quantitativa ou qualitativa é considerada uma mutação, podendo inferir em desordens

genéticas, na fertilidade e malformações fetais, caso o efeito genotóxico tenha atingido as células germinativas (Fonseca; Pereira, 2013).

A avaliação da genotoxicidade é essencial para a segurança ambiental e a saúde humana, especialmente no que diz respeito a produtos químicos industriais, medicamentos, alimentos, produtos cosméticos e agentes de radiação. Estudos de genotoxicidade podem ser realizado por uma variedade de testes, incluindo testes *in vitro* e *in vivo* (Ribeiro Salvatori; Marques, 2003).

2.3.2.1 Modelos para estudos genotóxicos

Os estudos genotóxicos desempenham um papel importante na avaliação dos efeitos que agentes físicos, químicos e biológicos podem ter sobre o material genético. Esses estudos ajudam a compreender os potenciais riscos à saúde humana e ambiental, além de identificar as substâncias que podem causar tais danos ao DNA. Dentre os modelos e ensaios utilizados para a análise de genotoxicidade, cada um desempenha características específicas, e podem ser desenvolvidos tanto estudos *in vivo* quanto *in vitro*, como em cultura de células, bactérias, roedores, além de modelos alternativos (Brasil, 2013; Sales *et al.*, 2018).

Essas técnicas são capazes de avaliar o processo de danos a partir do monitoramento de condições físico-químicas, ambientais, bem como avaliação dos riscos à exposição de determinados agentes (Valente *et al.*, 2017). Entretanto, a escolha do modelo e ensaio genotóxico depende da natureza do agente em estudo, das questões específicas que se busca responder e das considerações éticas envolvidas (Morales, 2008).

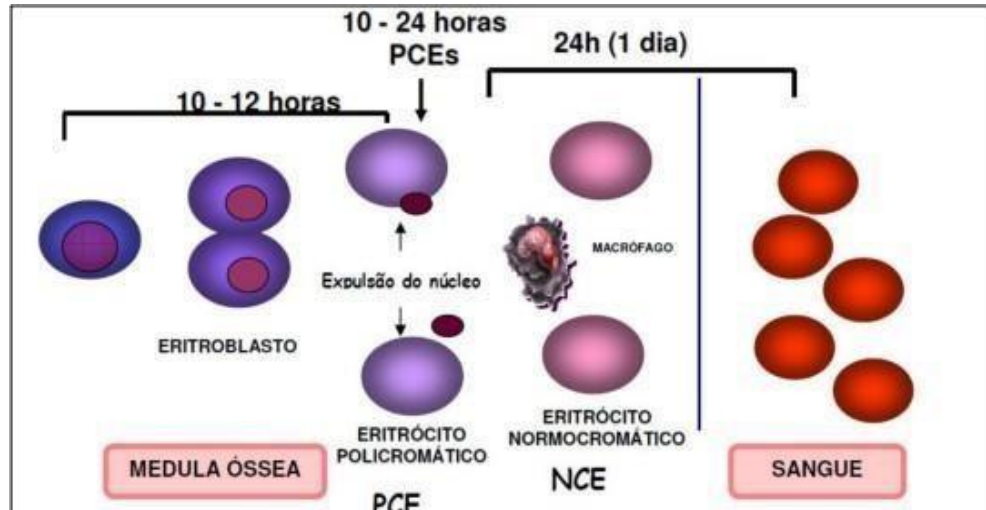
2.3.2.2. Teste do Micronúcleo

O teste do micronúcleo é um ensaio utilizado para avaliar a presença de danos no material genético, principalmente em células em divisão, que através de células do sangue periférico ou da medula óssea de roedores consegue detectar agentes clastogênicos (capazes de realizar a quebra de cromossomos) ou agentes aneugênicos (que induzem a segregação cromossômica anormal), indicando danos genotóxicos (Oecd, 2016a; Flores; Yamaguchi, 2008; Ribeiro Salvatori; Marques, 2003). Como matéria-prima para o teste, a medula óssea de qualquer mamífero pode ser utilizada, porém as mais indicadas pelos órgãos regulatórios são o sangue periférico de camundongos, como proposto por Hayashi *et al.* (1990) e a medula óssea de ratos e camundongos (Oecd, 1997).

Micronúcleos (MN) são pequenas estruturas que podem se formar quando cromossomos ou fragmentos de cromossomos não são distribuídos corretamente durante a divisão celular. Consistem em massas da cromatina com aparência de um pequeno núcleo, delimitados por uma membrana e separados do núcleo principal (Hayashi, 2016). Sua formação se dá a partir da quebra de cromossomos inteiros ou fragmentos acêntricos, a partir do atraso ou migração durante a anáfase, estando presente após a divisão celular nas células filhas (Bolognesi, 2003).

No indivíduo adulto, os eritrócitos originam-se principalmente na medula óssea (Contar *et al.*, 2000). Durante o processo de maturação, quando ocorre a expulsão do núcleo, geram os eritrócitos policromáticos, que são considerados células sanguíneas imaturas que ainda contêm alguma quantidade de RNA residual. Por sua vez, essas células quando coradas em esfregaço sanguíneo têm uma coloração azulada ou arroxeada, devido à presença do RNA. Após 24h, o eritrócito encontra-se maduro, gerando o eritrócito normocromático. Essas células possuem uma coloração vermelha característica, devido à presença de hemoglobina. Esses eritrócitos já não possuem RNA significativo e, portanto, não mostram a coloração azulada ou arroxeada (Figura 2) (Contar *et al.*, 2000; De Souza, 2015).

Figura 2 — Formação de eritrócitos policromáticos (PCEs) e eritrócitos normocromáticos (NCE)

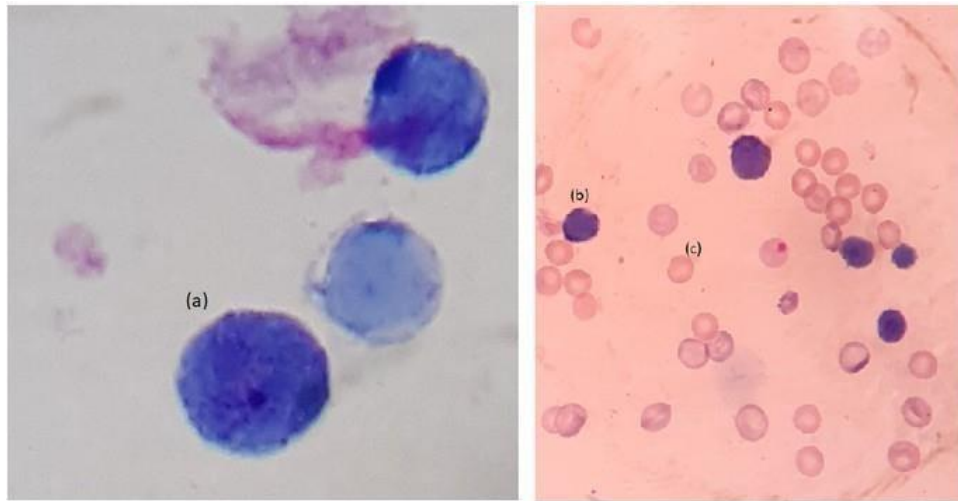


Fonte: adaptado de Souza, 2015.

Bollet e colaboradores na década de 1970 introduziram o termo micronúcleo, fazendo referência a corpos cromáticos com diâmetro menor que 1/3 do diâmetro do núcleo celular. Durante o processo de maturação celular, especificamente na telófase, o eritrócito policromático tem seu núcleo extrudado e os micronúcleos que foram formados podem permanecer no citoplasma, sendo eles compostos por uma porção de cromatina contendo fragmentos de cromossomos ou cromossomos inteiros (Mateuca *et al.*, 2006). Os micronúcleos

podem ser diferenciados pela presença ou ausência do cinetócoro localizado no centrômero, sendo o aparecimento de eritrócitos micronucleados imaturos o principal indício de dano (Figura 3) (Flores; Yamaguchi, 2008; OECD, 2016a).

Figura 3 — Eritócito policromático com micronúcleo (a) Eritrocito policromático sem núcleo (b) e eritrócito normocromáticos sem micronúcleo (c). Imagem microscópica em aumento de 1000x.



Fonte: O autor (2023).

As características básicas do teste do micronúcleo se baseia a partir dos dados observados que podem ser classificados quanto a produção de eritrócitos policromáticos (PCEs) (1) o efeito da substância teste é observado em eritrócitos policromáticos anucleados; (2) o eritrócito policromático tem um tempo de vida curto, sendo que a presença de micronúcleos é indicativa de dano cromossômico induzido recentemente; e (3) os micronúcleos são facilmente identificáveis e a sua distribuição é bem definida (Freitas, 2007; Fenech, 2000). Portanto, a presença de micronúcleos depende do tempo de amostragem. Além disso, o MN pode ocorrer como resultado de processos naturais, como o metabolismo ou o envelhecimento, ou pode ser induzido por muitos fatores ambientais, hábitos, doenças e substâncias químicas (Ribeiro; Salvadori; Marques, 2003).

Uma redução da proporção do número de eritrócitos policromáticos imaturos (PCEs) reflete em uma menor proporção na relação PCE/NCE, sendo então considerado um marcador de citotoxicidade (Shahrim et al., 2006). Logo a percentagem de eritrócitos policromáticos (PCE) no total de eritrócitos também pode ser determinada, utilizando esse dado como mais um parâmetro de toxicidade (ANVISA, 2010; OECD, 1997;).

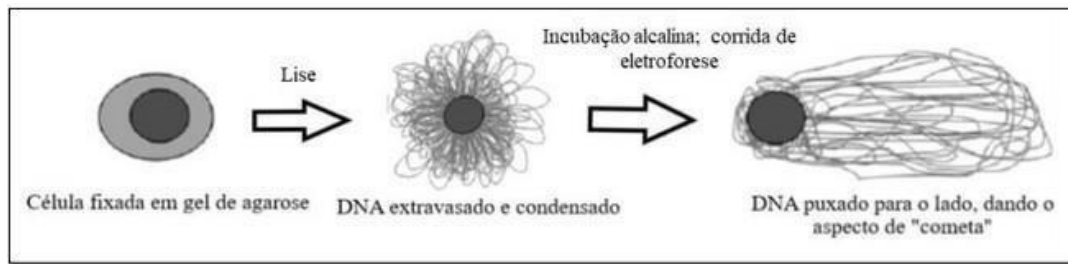
Para as análises dos resultados considera-se a proporção do total de eritrócitos em cada amostra. Sendo indicado para quantificação de eritrócitos micronucleados uma contagem mínima de 2000 células para cada lâmina. Na análise realizada por microscopia, a proporção de eritrócitos imaturos não deve superar 20% da quantidade de eritrócitos totais, onde resultados positivos indicam dano genotóxico cromossômico estrutural e/ou numérico (Araldi *et al.*, 2015; OECD, 2016a; Ribeiro; Salvadori; Marques, 2003; Ribeiro, 2006;).

2.3.3 Ensaio do cometa

O ensaio cometa ou teste do cometa, também conhecido como ensaio do cometa alcalino, é uma técnica utilizada em toxicologia e genotoxicologia para avaliar danos no DNA das células. Desenvolvido por Singh *et al.* 1988 essa técnica é especialmente útil para detectar danos causados por agentes químicos, radiação e outras substâncias genotóxicas. O SCGE *in vivo* (*single cell gel electrophoresis*) é um método sensível e que tem sido adaptado por outros autores, considerado de baixo custo, versátil e confiável da área de genética toxicológica (Lu; Y *et al.*, 2017; Oecd, 2016b).

A utilização do teste do cometa visa detectar os danos genômicos causados por agentes genotóxicos e é capaz de fornecer informações sobre os mecanismos de ação e também estudos de reparo do DNA, além da sua cinética e os tipos de lesões que podem ser corrigidas. Essa análise pode ser conduzida tanto *in vivo*, utilizando qualquer órgão ou tecido, ou *in vitro*, por meio de culturas celulares (Azqueta *et al.*, 2013; Ribeiro; Salvadori; Marques, 2003). A aplicação deste ensaio se norteia na capacidade de organização do DNA dentro do núcleo celular. Portanto, quando as células são fixadas em lâminas com gel de agarose, passam pela ação da solução de lise celular, onde o DNA é extravasado do meio intracelular. Sob meio alcalino ($\text{pH} \geq 13$) são submetidas à corrida de eletroforese. A partir desse ponto, os estímulos elétricos gerados permitem que fragmentos do DNA lesionado se dirijam para fora do núcleo celular, onde a intensidade com que ocorre a migração, refletirá na quantidade de material lesionado. Este fragmento remete a um aspecto de cometa, de onde surgiu a origem do termo ensaio cometa (Figura 4) (Cordelli *et al.*, 2021; Ribeiro; Salvadori; Marques, 2003; Collins, 2004).

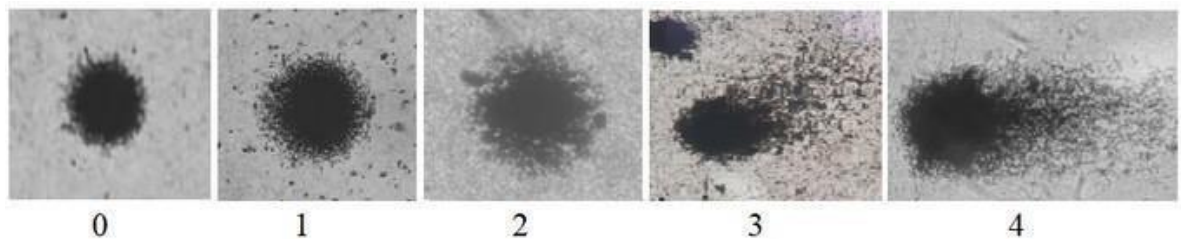
Figura 4 — Esquematização das células submetidas ao ensaio cometa.



Fonte: adaptado de Shaposhnikov *et al.*., 2009.

Com a imagem que remete a um cometa, com cabeça e cauda, após passar pela corrida de eletroforese, esses fragmentos de DNA podem ser dimensionadas e quantificados numa escala de 0 a 4, onde 0 indica nenhum dano, e o nível 4 maior dano. Através da microscopia é possível observar os níveis de danos (Figura 5) (Oecd,2016b; Møller, 2018).

Figura 5 — Escala de dano no ensaio cometa: 0 - sem danos; 1- baixo nível de dano; 2 -médio nível de dano; 3 – alto nível de dano; 4 – dano total.



Fonte: O autor (2023).

Visto que a nível celular toda célula possui dano ao DNA, considerando que o próprio metabolismo é capaz de gerar mais de 1000 lesões diariamente ao DNA/célula, dessa maneira, o teste do cometa é substancialmente comparativo, sendo categórica a presença dos grupos de controle negativo e positivo de forma simultânea na experimentação (Araldi *et al.*,2015)

Para as análises, 100 nucleoides selecionados aleatoriamente por microscopia óptica e são classificados numa classe de cinco níveis de dano (0,1,2,3,4) de acordo com a intensidade e o padrão de arraste do material genético degradado. O índice de DNA (DDI) foi calculado de acordo com a metodologia de Fernandes;Bustos- Obregon; Salvatori (2015).

3. OBJETIVOS

3.1 GERAL

Avaliar a toxicidade aguda e toxicogenética do extrato aquoso dos caules de *Aristolochia ridicula*.

3.2 ESPECÍFICOS

- Determinar a DL50 do extrato aquoso dos caules de *A ridicula*.
- Investigar o potencial genotóxico do extrato de *A. ridicula* em células de ratos Wistar *in vivo* pelo ensaio cometa.
- Avaliar os possíveis efeitos citotóxicos e mutagênicos do extrato aquoso de caules de *A. ridicula* em células de ratos Wistar pelo teste do micronúcleo.
- Avaliar os parâmetros comportamentais e fisiológicos nos animais tratados com o extrato aquoso de caules de *A. ridicula*.

4. REFERÊNCIAS

- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA. Registro de Produtos Biológicos/Bases Legais e Guias – Coletânea. Brasília: **ANVISA/Ministério da Saúde**, 2011.
- ABE, L. T. et al. Compostos fenólicos e capacidade antioxidante de cultivares de uvas *Vitis labrusca* L. e *Vitis vinifera* L. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 27(2):394-400, 2007.
- ABUDAYYAK, M. et al. Investigation on the toxic potential of *Tribulus terrestris* in vitro. **Pharmaceutical biology**, v. 53, n. 4, p. 469-476, 2015.
- ALVES, L. F. Produção de Fitoterápicos no Brasil: Histórias, Problemas e Perspectivas. UFF. **Revista Virtual de Química**, Niterói, v.5, n.3, p. 450-513, 2013.
- ALMEIDA, M. Z. de. **Plantas medicinais** [online]. 3. ed. Salvador: EDUFBA, 2011.221 p.
- ALMEIDA R. T. et al. A valorização das plantas medicinais como alternativa à saúde: um estudo etnobotânico. **Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais**, v. 11, n. 1, p. 412 - 428, 2020
- ALVIANO, W. S. et al. In vitro antioxidant potential of medicinal plant extracts and their activities against oral bacteria based on Brazilian folk medicine. **Archives of Oral Biology**, v. 53, n. 6, p. 545-552, 2008.
- ALEIXO, Á. A. et al. Antibacterial and cytotoxic antibacterial potential of ethanol extract and fractions from *Aristolochia galeata* Mart. ex Zucc. **Journal of Medicinal Plant Research**, [s.l.], v. 8, n. 7, p. 326-330, fev. 2014.
- ARGENTA, S. C. et al. Plantas medicinais: cultura popular versus ciência. **Vivências**, v. 7, n. 12, p. 51-60, 2011.
- ARALDI, Rodrigo Pinheiro et al. Using the comet and micronucleus assays for genotoxicity studies: A review. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 72, p. 74-82, 2015.
- AZQUETA, A. et al. Enhancing the sensitivity of the comet assay as a genotoxicity test, by combining it with bacterial repair enzyme FPG. **Mutagenesis**, v. 28, n. 3, p. 271-277, 2013.
- BERJANO, R. et al. Cytotaxonomy of diploid and polyploid *Aristolochia* (Aristolochiaceae) species based on the distribution of CMA/DAPI bands and 5S and 45S rDNA sites. **Plant Systematics and evolution**, v. 280, p. 219-227, 2009.
- BOLOGNESI, C. Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies. **Mutation Research**, v. 543, p. 251-272, 2003
- BRASIL. **Decreto Presidencial nº 5.813 de 22 de junho de 2006**. Aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e dá outras providências. Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 23 de junho de 2006.

BRASIL. **Portaria nº 971, de 03 de maio de 2006**. Dispõe sobre a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde. Diário Oficial da União, 3 Maio 2006.

BRASIL. Ministério da saúde. **Portaria Interministerial nº 2.960, de 9 de dezembro de 2008**. Aprova o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e cria o Comitê Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. Diário Oficial da União. Brasília: Poder Executivo, 10 de dezembro de 2008.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação; CONCEUA. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. **Resolução Normativa nº 15, de 16 de dezembro de 2013**. Baixa a Estrutura Física e Ambiente de Roedores e Lagomorfos do Guia Brasileiro de Criação e Utilização de Animais para Atividades de Ensino e Pesquisa Científica. 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Guia para Condução de Estudos Não Clínicos de Toxicologia e Segurança Farmacológica Necessários ao Desenvolvimento de Medicamentos**. Brasília, 2013.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 26, de 13 de maio de 2014**. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos. Diário Oficial da União. Brasília: Poder Executivo.

BRUHN, J. G.; HOLMSTEDT, B. Ethnopharmacology: objectives, principles and perspectives. In: BEALE, J. L.; REINHARD, E. (Ed). **Natural products as medicinal agents**. Stuttgart: Hippokrates, 1981. p.405-430

CAMPOS, S. C. et al.. Toxicidade de espécies vegetais. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 18, n. 1, p. 373–382, 2016.

CASTRO, M. R.; FIGUEIREDO, F. F. Estudos e pesquisas sobre o uso de plantas medicinais e fitoterápicos no Brasil: caminhos e desafios. **Ar@cne**. Revista Eletrônica de Recursos de Internet sobre Geografia y Ciencias Sociales, n. 240, p. 1-20, 2020.

CASTRO, R.; ALBIERO, A. O mercado de matérias primas para indústria de fitoterápicos. **Revista Fitos**, v. 10, n. 1, 2016.

CARNEIRO, Fernando JC et al. Bi-and tetraflavonoids from *Aristolochia ridicula*. **Phytochemistry**, v. 55, n. 7, p. 823-832, 2000.

CARNEIRO, Fernanda Melo et al. Tendências dos estudos com plantas medicinais no Brasil. **Revista Sapiência: sociedade, saberes e práticas educacionais**, v. 3, n. 2, p. 44-75, 2014.

CHEN, Tao. Genotoxicity of aristolochic acid: a review. **Journal of Food and Drug Analysis**, v.15, n. 4, p. 387-399, 2007.

COLET, Cristiane F. et al. Análises das embalagens de plantas medicinais comercializadas em farmácias e drogarias do município de Ijuí/RS. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 17, p. 331-339, 2015.

COLLINS, Andrew R. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. **Molecular biotechnology**, v. 26, n. 3, p. 249-261, 2004.

COMHAIR, Suzy AA; ERZURUM, Serpil C. Antioxidant responses to oxidant-mediated lung diseases. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, 2002.

CONTAR, Juida de Deus Palma et al. Estudos sobre a leitura de eritrócitos micronucleados em camundongos tratados com anabolizantes. **Journal of Physical Education**, v. 11, n. 1, p. 3-10, 2000.

CORDELLI, E.; BIGNAMI, M.; PACCHIEROTTI, F. Comet assay: a versatile but complex tool in genotoxicity testing. **Toxicol Res (Camb)**, v. 10, n. 1, p. 68-78, 2021. DOI: 10.1093/toxres/tfaa093.

DANTAS, F. G. D. S. (2019). Teste de Ames para avaliação do potencial mutagênico de plantas medicinais e novas moléculas com atividades biológicas.

DEMARTELAERE, Andréa Celina Ferreira et al. Aspectos farmacológicos das plantas medicinais e as implicações com o meio ambiente: revisão bibliográfica: Pharmacological aspects of medicinal plants and the implications for the environment: literature review. **Brazilian Journal of Development**, v. 8, n. 10, p. 69198-69219, 2022.

DENNY, K. H.; STEWART, C. W. Chapter 5-Acute, sub-acute, subchronic and chronic general toxicity testing for preclinical drug development. 2013.

DE SOUZA, C. S. H. **Genotoxicidade e citotoxicidade de corantes azoicos em ensaio do micronúcleo in vivo (Swiss albinus)**. 2015. 73p. Dissertação de Mestrado (Pós-Graduação StrictoSensu em Ciência Animal) – Universidade José do Rosário Vellano, Alfenas, 2015.

DE MORAES ARNOSO, Bernardo Junqueira; DA COSTA, Giselle França; SCHMIDT, Betina. Biodisponibilidade e classificação de compostos fenólicos. **Nutrição Brasil**, v. 18, n. 1, p. 39-48, 2019.

DIRIR, Amina Mukhtar; CHERUTH, Fábio Jaleel; KSIKSI, Taoufik Saleh. Etnomedicina, fitoquímica e farmacologia de Calotropis procera e Tribulus terrestris. **Revista de Remédios Naturais**, p. 38-47, 2017. **Journal of Natural Remedies**, v. 17, n. 2, p. 37-46, 2017.

DÜSMAN, Elisângela et al. Principais agentes mutagênicos e carcinogênicos de exposição humana. **SaBios-Revista de Saúde e Biologia**, v. 7, n. 2, 2012.

EPAGRI, Empresa Catarinense de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina. Cipó-mil-homem (Aristolochia triangulares): mitos e verdades. Levantamento Socioambiental do Inventário Florístico Florestal de Santa Catarina, **Folder de divulgação**, 2011.

ERBAR, C.; HEILER, A.; LEINS, P. Nectaries in fly-deceptive pitcher-trap blossoms of Aristolochia. **Flora**, v. 232, p. 128-141, 2017

FARMACOPÉIA BRASILEIRA, volume I e II monografias. **Insumos Farmacêuticos e Especialidades EF197-00, IF282-01, EF198-00**, 6ª ed. Brasília, 2019.

FARIA, Bruna et al. Ácido aristolóquico-nefropatia e o cancro. I. Índice., **Acta Portuguesa de Nutrição**, v.24, p.70-75, 2021.

FERNANDES, J. M. **Morfologia de plantas medicinais utilizadas em Alta Floresta: subsídios ao ensino, pesquisa e extensão em Botânica**. Alta Floresta: Pantanal Editora, 2022.

FERNANDES, José Martins et al. Contribuição à taxonomia do gênero *Aristolochia* (Aristolochiaceae) no Estado de Mato Grosso, com uma nova ocorrência para o Brasil. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 10, p. e518101018676-e518101018676, 2021.

FERNANDES, Fabio Henrique; BUSTOS-OBREGON, Eduardo; SALVADORI, Daisy Maria Fávero. Disperse Red 1 (textile dye) induces cytotoxic and genotoxic effects in mouse germ cells. **Reproductive Toxicology**, v. 53, p. 75-81, 2015.

FLORES, Mônica; YAMAGUCHI, Mirian Ueda. Teste do micronúcleo: uma triagem para avaliação genotóxica. **Saúde e Pesquisa**, v. 1, n. 3, p. 337-340, 2008.

FONSECA, J. C. L., MARCHI, M. R. R. & FONSECA, J. C. L. Programa Internacional de Segurança Química - Substâncias Químicas Perigosas à Saúde e ao Ambiente. **Cultura Acadêmica**, São Paulo-SP. p. 119. 2008. Disponível em: https://www2.unesp.br/Home/costsa_ses/20110610_084213.PDF

FONSECA, Cristiane Alves da; PEREIRA, Denise Gonçalves. Aplicação da genética toxicológica em planta com atividade medicinal. **Infarma - Ciências Farmacêuticas**, [S.l.], v. 16, n. 7/8, p. 51-54, jan. 2013.

FENNER, Raquel et al. Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, p. 369-394, 2006.

FENECH, Michael. The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 455, n. 1-2, p. 81-95, 2000.

FREI, H. et al. Aristolochic acid is mutagenic and recombinogenic in *Drosophila* genotoxicity tests. **Archives of toxicology**, v. 56, p. 158-166, 1985.

FREITAS, J.; LIRIO, E.J.; BARROS, F.; GONZÁLEZ, F. *Aristolochiaceae in Flora do Brasil*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2020.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P.. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374–381, mar. 2007.

HAN, Jiayin et al. Systematic overview of aristolochic acids: nephrotoxicity, carcinogenicity, and underlying mechanisms. **Frontiers in Pharmacology**, v. 10, p. 648, 2019.

HAYASHI, M.; MORITA, T.; KODAMA, Y.; SOFUNI, T.; ISHIDATE, J. R. M. The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange coated slides. **Mutation Research Letters**, v. 245, p. 245-249, 1990.

HAYASHI, Makoto. The micronucleus test—most widely used in vivo genotoxicity test—. **Genes and Environment**, v. 38, n. 1, p. 18, 2016.

HASENCLEVER, Lia et al. A indústria de fitoterápicos brasileira: desafios e oportunidades. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 22, n. 8, p. 2559-2569, 2017.

HARA, R.; LOPES B.; SANTOS, F.; OLIVEIRA, R. Aplicabilidade de ensaios da genética toxicológica no biomonitoramento de ambientes aquáticos e promoção da saúde humana. **Revista Terra & Cultura: Cadernos de Ensino e Pesquisa**, v. 25, n. 48-49, p. 20-25, set. 2018

HEINRICH, Michael et al. Local uses of Aristolochia species and content of nephrotoxic aristolochic acid 1 and 2—A global assessment based on bibliographic sources. **Journal of ethnopharmacology**, v. 125, n. 1, p. 108-144, 2009.

HIPÓLITO, J.; VIANA, B. F.; SELBACH-SCHNADELBACH, A.; GALETTO, L.; KEVAN, P. G. Pollination biology and genetic variability of a giant perfumed flower (*Aristolochia gigantea* Mart. and Zucc., Aristolochiaceae) visited mainly by small Diptera. **Botany**, v. 90, n. 9, p. 815-829, 2012.

JABLONKA, Eva; LAMB, Marion J. **Transgenerational epigenetic inheritance**. 2010.

KAR, D.R. et al. Review on Phyto-chemistry & pharmacological activity of *Melia azedarach*. **International Journal of Experimental Research and Review**, v. 28, p. 38-46, 2022.

KANG, Yu-Chan et al. Aristolochic acid-associated urinary tract cancers: an updated meta-analysis of risk and oncologic outcomes after surgery and systematic review of molecular alterations observed in human studies. **Therapeutic Advances in Drug Safety**, v. 12, p. 2042098621997727, 2021.

KOHARA, Arihiro et al. Mutagenicidade do ácido aristolóquico em camundongos transgênicos lambda/lacZ (camundongo Muta™). **Pesquisa de Mutações/Toxicologia Genética e Mutagênese Ambiental**, v. 515, n. 1-2, p. 63-72, 2002.

KNAAPEN, Ad M. et al. Neutrophils and respiratory tract DNA damage and mutagenesis: a review. **Mutagenesis**, v. 21, n. 4, p. 225-236, 2006.

KUO, P-C.; LI, Y-C.; WU, T-S. Chemical constituents and pharmacology of the *Aristolochia* species. **Journal of Traditional Complementary Medicine**, v.2, n.4, p.249-266, 2012.

LEÓN-DÍAZ, Rosalba et al. Antimycobacterial neolignans isolated from *Aristolochia taliscana*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, p. 45-51, 2010.

- LOPES, L. M. X.; NASCIMENTO, I. R.; SILVA, T. Phytochemistry of the Aristolochiaceae family. In: MOHAN, R. M. (Ed.). Research advances in phytochemistry, Kerala: **Global ResearchNetwork**, 2001. p. 19-108.
- LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. Plantas medicinais no Brasil nativas e exóticas. Nova Odessa: **Instituto Plantarum**, 2002. p. 321-322.
- LIMA, K. M. S. V.; SILVA, K. L.; TESSER, C. D.. Práticas integrativas e complementares e relação com promoção da saúde: experiência de um serviço municipal de saúde. **Interface Comunicação, Saúde, Educação**, v. 18, n. 49, p. 261–272, abr. 2014.
- LU, Y; LIU, Y; YANG, C. Evaluating in vitro DNA damage using comet assay. **JoVE (Journal of Visualized Experiments)**, n. 128, p. e56450, 2017. MAUAD, T. Horta comunitária da faculdade de medicina universidade de São Paulo. **Guia informativo sobre plantas medicinais**. São Paulo, 2016.
- MACIEL, M. A. M. et al.. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. Química Nova, v. 25, n. 3, p. 429–438, maio 2002. **Comunicação, Saúde, Educação**, v. 18, n. 49.
- MAGALHÃES, K.N. **Plantas medicinais da Caatinga do Nordeste brasileiro: etnofarmacopeia do professor Francisco José de Abreu Matos**. 219p. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Brasil, 2019.
- MALONE, M.H.; ROBICHAUD, R.C. A Hippocratic screen for pure or crude drug materials. In: **Lloydia**, v.25, p.320-32, 1962.
- MARMITT, D. J.; REMPEL, C.; GOETTERT, M. I.; COUTO E SILVA, A.; POMBO, C. N. F. Revisión sistemática de las plantas de interés para el Sistema de Salud com potencial terapéutico cardiovascular. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 21, n.1, p. 108-124, 2016.
- MACHADO, M. B.; LOPES, L. M. X. Tetraflavonoid and biflavonoids from Aristolochia ridicula. **Phytochemistry**, v. 69, p. 3095-3102, 2008.
- MATEUCA, Raluca et al. Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring. **Biochimie**, v. 88, n. 11, p. 1515-1531, 2006.
- MENEZES, Sabrina Lima Murussi. **Plantas e metabólitos secundários: uma proposta para o ensino de química orgânica**. 2020. Dissertação de Mestrado. Universidade Tecnológica Federal do Paraná.
- MESSIANO, Gisele B. et al. Evaluation of insecticidal activity of diterpenes and lignans from Aristolochia malmeana against Anticarsia gemmatalis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 8, p. 2655-2659, 2008.
- MØLLER, Peter. The comet assay: ready for 30 more years. **Mutagenesis**, v. 33, n. 1, p. 1-7, 2018.
- MORALES, Marcelo M. Métodos alternativos à utilização de animais em pesquisa

científica: mito ou realidade?. **Ciência e Cultura**, v. 60, n. 2, p. 33-36, 2008.

MOURA, Naiara et al. Ensaios toxicológicos: Um estudo sobre a utilização de testes in vivo e invitro. **Enciclopédia biosfera**, v. 8, n. 15, 2012.

MUELLER, Larissa Pires et al. The Aristolochia (Aristolochiaceae) genus: therapeutic properties, biological effects and toxicity. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 11, p. e293111133504-e293111133504, 2022.

NASCIMENTO, D.S.; CERVI, A.C.; GUIMARÃES, O.A. A família Aristolochiaceae Juss. noestado do Paraná, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v.24, n.2, p.414-422, 2010.

NAVICKIENE, Hosana; LOPES, Lucia MX. Alkamides and phenethyl derivatives fromAristolochia gehrtii. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 12, p. 467-472, 2001.

NETO, L.G; GOMES, F.T. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais utilizadas pelapopulação do município de Oliveira Fortes-MG. **Biológicas & Saúde**, v. 8, n. 27, 2018.

NOGUEIRA, João Carlos et al. Levantamento de uso popular de plantas medicinais no municípiode Niquelândia–GO. **Enciclopédia Biosfera**, v. 9, n. 16, 2013.

OECD, 2008. **OECD Guideline for the testing of chemicals**. No 425: Acute Oral Toxicity – Up-and-Down Procedure (UDP).

OECD, 2016a. **OECD Guideline for the testing of chemicals**. No474: Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test.

OECD, 2016b. **OECD Guideline for the testing of chemicals**. No 489: In Vivo Mammalian Alkaline Comet Assay.

OLIVEIRA, C. R.; LOPES, L. M. Sequestro e biotransformação de lignanas de Aristolochia gibertipor larvas de Battus polydamas (Papilionidae: Troidini). **Planta Médica**, v. 79, n. 13, p. PI67, 2013.

OLIVEIRA, F. Q.; GONÇALVES L. A. Conhecimento sobre plantas medicinais e fitoterápicos e potencial de toxicidade por usuários de Belo Horizonte, Minas Gerais. **Revista Eletrônica de Farmácia**. v.3, n.2, p. 36-41, 2006.

OMS. Organização Mundial Da Saúde. **Programa Internacional de Segurança Química. Substâncias químicas perigosas à saúde e ao ambiente**. 2008.

OMS. Organização Mundial Da Saúde. Bulletin of the World Health Or- ganization: Regulatory situation of herbal medicines- **A world wide review**. Geneva, 1998.

OMS. Organização Mundial Da Saúde. **Cuidados primários de saúde**. Brasília, 1979. 64p. Alma-Ata, 1978.

PAULERT, R.; ZONETTI, P.C.; ROSSET, I.G. Aristolochia não é planta medicinal de uso

interno: uma revisão. **Rev Bras Plantas Med**, Maringá, v.19, n.3, p. 409-418, 2017.

PEDROSO, Reginaldo dos Santos; ANDRADE, Gêssica; PIRES, Regina Helena. Plantas medicinais: uma abordagem sobre o uso seguro e racional. **Physis: Revista de Saúde Coletiva**, v. 31, 2021.

PISOSCHI, A.M.; POP, A.; CIMPEANU, C.; PREDOI, G. Antioxidant capacity determination in plants and plant-derived products: a review. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, vol. 26, p.1-36, 2016.

RIBEIRO, Lúcia Regina; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. Teste do micronúcleo em medula óssea de roedores in vivo. **Mutagênese Ambiental. ULBRA, Canoas**, p. 173-178, 2003.

RODRIGUÉZ, I.I.G. **Avaliação da atividade antiofídica de Aristolochia sprucei: isolamento e caracterização estrutural de composto bioativo**. 109p. Dissertação de mestrado – Área de concentração: Toxicologia - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da USP, Ribeirão Preto, São Paulo. 2010.

RODRIGUES, Valéria Evangelista Gomes; CARVALHO, Douglas Antônio de. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais no domínio do cerrado na região do Alto Rio Grande-Minas Gerais. **Ciência e agrotecnologia**, v. 25, n. 1, p. 102-123, 2001.

SALES, I.M.S.; SILVA, J.M.; MOURA, E.S.R.; ALVES, F.D.S.; SILVA, F.C.C.; SOUSA, J.M.C.; PERON, A.P. Toxicity of synthetic flavorings, nature identical and artificial, to hematopoietic tissue cells of rodents. **Brazilian Journal of Biology**, vol. 78, n.2, p. 306-310, 2018.

SANTOS, R.L. et al. Análise sobre a fitoterapia como prática integrativa no Sistema Único de Saúde. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.13, n.4, p.486-91, 2011.

SANTOS, F. S. D. DOS .. Tradições populares de uso de plantas medicinais na Amazônia. **História, Ciências, Saúde-Manguinhos**, v. 6, p. 919-939, set. 2000.

SANTOS, Beatrice Paiva et al. Indústria 4.0: desafios e oportunidades. **Revista Produção e Desenvolvimento**, v. 4, n. 1, p. 111-124, 2018.

SALOMÉ, Dayana da Costa et al. Aristolochia trilobata: Identification of the anti-inflammatory and antinociceptive effects. **Biomedicines**, v. 8, n. 5, p. 111, 2020.

SAMANTA, Debangshu et al. Hypoxia-inducible factors are required for chemotherapy resistance of breast cancer stem cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 50, p. E5429-E5438, 2014.

SILVA, Marília Lordêlo Cardoso et al. Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, n. 3, p. 669-681, 2010.

SILVA, M. G. DA., FURTADO, M. M., OSÓRIO, A. T. ., MORAIS, I. C. P. DA S. ., AMARAL,

M. P. M., COELHO, A. G., & ARCANJO, D. D. R. A importância dos ensaios de toxicidade para o desenvolvimento e o registro de fitoterápicos no Brasil. **Research, Society and Development**, 10(12), 2021.

SHAPOSHNIKOV, S.; FRENGEN, E.; COLLINS, A.R. Increasing the resolution of the comet assay using fluorescent in situ hybridization—a Review. **Mutagenesis**, v. 24, n. 5 p. 383– 389, abr.2009.

SHAHRIM, Zaizuhana et al. The in vivo rodent micronucleus assay of Kacip Fatimah (*Labisia pumila*) extract. **Tropical Biomedicine**, v. 23, n. 2, p. 214-219, 2006.

SIBBR. Sistema de Informação sobre a Biodiversidade Brasileira. *Aristolochia ridícula*. in: **Fichade Espécies do Sistema de Informação sobre a Biodiversidade Brasileira**. 2021.

SOARES, Sergio Eduardo. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de nutrição**, v. 15, p. 71-81, 2002.

SOARES, Aparecida Rios et al. Uso popular de *Aristolochia* spp na prevenção e tratamento do câncer. **Multitemas**, p. 149-162, 2022.

SŁOCZYŃSKA, Karolina et al. Antimutagenic compounds and their possible mechanisms of action. **Journal of applied genetics**, v. 55, p. 273-285, 2014.

VASCONCELOS, Sandra Mary Lima et al. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química nova**, v. 30, p. 1323-1338, 2007.

VALENTE, Daniel et al. Utilização de biomarcadores de genotoxicidade e expressão gênica na avaliação de trabalhadores de postos de combustíveis expostos a vapores de gasolina. **Revista Brasileira de Saúde Ocupacional**, v. 42, p. e2s, 2017.

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

VOGEL, K.; RISKEN, H. Determination of quasiprobability distributions in terms of probability distributions for the rotated quadrature phase. **Physical Review A**, v. 40, n. 5, p. 2847, 1989.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **General Guidelines for Methodologies on Research and Evaluation of Traditional Medicine**. Geneva. , 2000.

WIEBRECHT, A. The Safety of Asarum – An Evaluation. **Deutsche Zeitschrift für Akupunktur**, v.54, n.2, p. 47-50, 2011.

WU, T. et al. Chemical constituents and pharmacology of *Aristolochia* species. **Studies in natural products chemistry**, v. 32, p. 855, 2005.

ZHOU, Yang et al. Worldwide research trends on aristolochic acids (1957–2017): Suggestions for researchers. **PloS one**, v. 14, n. 5, p. e0216135, 2019.

5. APÊNDICES

Artigo 1 : Este trabalho deu origem ao artigo: “FROM FOLK KNOWLEDGE TO SCIENCE: AN OVERVIEW OF STUDIES ON THE GENUS *Aristolochia* (2013-2023)”.

Submetido na revista Fronteiras (Qualis A4 na área de Medicina II)

<http://periodicos.unievangelica.edu.br/index.php/fronteiras/about/submissions#authorguidelines>

FROM FOLK KNOWLEDGE TO SCIENCE: AN OVERVIEW OF STUDIES ON THE GENUS *Aristolochia* (2013-2023)

Abstract

The use of medicinal plants, deeply rooted in the history and tradition of various communities, has recently gained prominence on the global stage. Despite the generational transmission of this therapeutic knowledge, certain plants, such as those belonging to the *Aristolochia* genus (Aristolochiaceae), widely utilized by traditional populations, need more detailed studies on the composition of bioactive molecules and their toxicity. Therefore, this paper aims to present an overview of publications on the Aristolochiaceae family from 2013 to 2023, specifically, on the genus *Aristolochia*, focusing on its chemical constituents and biological/therapeutic activities. A bibliographic search was conducted in databases from 2013 to 2023, utilizing only open-access articles. The analysis revealed variations in the number of articles published, with an increase in the last three years, addressing the effectiveness of the traditional use of these plants based on popular knowledge. The analysis revealed variations in the number of articles addressing the effectiveness of the traditional use of these plants based on popular knowledge. Remarkably, approximately 70% of research articles on the *Aristolochia* genus are restricted, suggesting a potential connection with new research and discoveries of biomolecules. The diverse composition of secondary metabolites in different parts of the plants influences their phytotherapeutic properties, resulting in specific biological and therapeutic applications. This study contributes to a comprehensive understanding of the *Aristolochia* genus, exploring its therapeutic potential and emphasizing the need for further investigations into its composition and toxicity.

Keywords: Common knowledge; Ethnobotanical studies; Biological activity

Resumo

O uso de plantas medicinais, enraizado na história e tradição de várias comunidades, tem ganhado destaque no cenário mundial. Apesar da transmissão geracional desse conhecimento terapêutico, algumas plantas, como as do gênero *Aristolochia* (Aristolochiaceae), amplamente utilizadas por populações tradicionais, carecem de estudos detalhados sobre a composição de moléculas bioativas e sua toxicidade. Deste modo, este estudo visa apresentar o panorama de publicações sobre a família Aristolochiaceae e gênero *Aristolochia*, seus constituintes químicos e atividades biológicas e terapêuticas. Foi realizada uma pesquisa bibliográfica em bases de dados entre 2013 a 2023, sendo utilizados apenas artigos de acesso livre. A análise revelou variações no número de artigos publicados, com aumento nos últimos três anos, abordando a eficácia do uso tradicional dessas plantas com base no conhecimento popular. Notavelmente, cerca de 70% dos artigos de pesquisa sobre o gênero *Aristolochia* são de acesso restrito, indicando possível relação com novas pesquisas e descobertas de biomoléculas. A composição diversificada de metabólitos secundários nas diferentes partes das plantas influencia suas propriedades fitoterápicas, resultando em aplicações biológicas e terapêuticas específicas. Este estudo contribui para a compreensão abrangente do gênero *Aristolochia*, explorando suas potencialidades terapêuticas e a necessidade de investigações mais aprofundadas sobre sua composição e toxicidade.

Palavras-chave: Conhecimento popular; Estudos etnobotânicos; Atividade biológica.

1. Introduction

Throughout the centuries, using plants for medicinal purposes has been intertwined with human history. This age-old tradition, dating back to the dawn of history, is experiencing renewed interest in modern times. In this contemporary setting, people are increasingly seeking more natural and holistic alternatives for health care, reflecting a growing demand for preventive and health-promoting approaches. This trend not only underscores the therapeutic efficacy of plants but also emphasizes the cultural significance inherent in their use, rooted in the traditions of diverse groups and communities over time (Dhole et al., 2021; Kar et al., 2022; Jamal, 2023).

Research in the field of phytochemicals begins with observations of folk knowledge. With the integration of more sophisticated and precise techniques, it opens up significant possibilities for new pharmacological discoveries. Studies have demonstrated the effectiveness of certain herbs in treating specific diseases, prompting professionals and patients to seriously consider herbal medicines (Choudhury et al., 2023; Ünlüyol et al., 2023). Thus, the interconnection between traditional wisdom and scientific advances creates fertile ground for innovative approaches primarily directed toward healthcare (Hill, 2022). Ongoing research in this field validates popular knowledge practices and promotes an evolution in the understanding and application of medicinal plants.

Medicinal plants, as defined by the World Health Organization (WHO, 2019), contain a substance in one or more organs that can be used for therapeutic purposes or as a precursor for drug synthesis. This definition highlights the complexity and richness of these organisms, emphasizing their role as sources of medicinally potent substances. Authors such as Kurek et al. (2022) and Zazouli et al. (2022) underscore that medicinal plants represent a valuable source of bioactive substances, which can be directed towards producing various bioactive compounds/molecules with vast potential applications. In developing countries, approximately 70% to 95% of the population uses medicinal plants to address health issues (Liaqat et al., 2019).

Herbal medicines have become more prevalent in contemporary healthcare systems in recent years. Integrative medicine has gained popularity in hospitals and clinics worldwide, integrating traditional medical procedures with complementary therapies such as herbal medicine (Jaiswal & Williams, 2017). The potential advantages of including plant-based treatments in treatment regimens are now widely recognized by healthcare professionals, especially for chronic diseases that benefit from a more holistic approach (Ali et al., 2015; Panossian et al., 2021).

Herbal medicine is regaining popularity, not as a rejection of modern medicine but as a recognition of the essential contributions of conventional and evidence-based approaches to treatment. This integrative approach acknowledges the historical value of these practices. It sheds light on future possibilities that can arise from combining traditional knowledge with scientific advancements, enabling the discovery of new compounds for innovative drug development (Guido et al., 2015; Gittelman, 2016). Through rigorous scientific investigation and the application of methodologies, significant results and opportunities can be obtained that may revolutionize approaches to well-being and promote alternative treatments (Jamal, 2023).

Brazil, renowned for its extraordinary plant biodiversity, is one of the wealthiest countries in plant species variety. This wealth offers a wide range of plants with biologically active substances with high potential for pharmacological and therapeutic applications (Castro & Figueiredo, 2020), known as medicinal plants. These plants have gained recognition in evidence-based medicine. Scientific studies are being conducted to validate their use, explore their mechanisms of action, and facilitate their application as herbal medicines. This recognition is driven by plants' broad therapeutic applicability (Da Silva et al., 2021).

Several factors contribute to the widespread use of medicinal plants, such as ease of access, low cost, and the beliefs passed down through generations (Aziz et al., 2017; Anand et al., 2022). However, given the realization that a significant portion of the population uses medicinal plants empirically and randomly, solely based on local knowledge transmitted by the community (De Medeiros et al., 2021), a more in-depth investigation of the actual application of these plants and their phytochemical constituents becomes crucial, considering that some may contain substances considered toxic (van Wyk & Prinsloo, 2020; Silva & De Melo Guedes, 2022). Plants can synthesize various chemical compounds due to millions of years of evolution and use these bioactive substances for various purposes, including defense against predators, attraction of pollinators, and adaptation to environmental stress (Boy et al., 2018).

Research on medicinal plants and their bioactive constituents aims not only to understand the pharmacological effects of these compounds but also to assess the potential toxicity associated with their use (Vaou et al., 2021). Thus, conducting in-depth studies on the bioactive compounds in consumed medicinal plants is an urgent need (Tuama & Mohammed, 2019). Different scientific approaches are essential to provide valuable insights into the safety and efficacy of medicinal plant use and contribute to developing guidelines guiding the responsible use of these natural resources.

The benefits of adopting herbal medicines include safety, efficacy, cultural preferences, accessibility, and ease of supply. However, some ethnobotanical studies have noted that traditional medicinal plants are not selected randomly; certain plant families are used consistently (Arias et al., 2020). The medicinal flora of a particular region is typically dominated by a small number of local plant families, as determined by various statistical methodologies (Van Wyk, 2020). Similarly, ethnobotanists have quantified the extent to which these preferences are shared among cultures to conclude the selection of species for medicinal purposes and the relative weights of knowledge transfer versus independent factors, shared selection criteria, and other considerations, such as the discovery of efficiency in affecting species selection (Nikesh & Maddi, 2023).

A notable example is the Aristolochiaceae family of plants, commonly known as Aristolochia. This family includes plant species in various parts of the world, especially in tropical and subtropical climates, including Brazil (Pereira et al., 2018). They are considered perennial herbs, climbers, shrubs, or small trees with peculiar flowers, often tubular or funnel-shaped. The leaves can be alternate or opposite, varying in shape and size, known colloquially as “jarrinha,” “papo-de-peru,” “cassaú,” “cipó mil-homens” or “cipó-milome,” “serpentaria,” “patito,” “cipó-mata-cobra,” “angelicó,” among others (Nascimento et al., 2010; Freitas et al., 2020).

These plants are considered widely used medicinal plants. Each species has distinct applications that may be related to their composition of bioactive molecules (Fernandes et al., 2021). Although scientific knowledge about species belonging to this genus is still limited, it is recognized that many of them are native to Brazilian biomes and present promising ethnopharmacological potential (Mueller et al., 2022). These authors emphasize that for this reason, these plants are the subject of new studies aiming to clarify both their toxicological potential and pharmacological effects, necessitating in-depth research to guide the safe utilization of these plants. The present study seeks to present an overview of studies on the Aristolochiaceae family from 2013 to 2023, including an analysis of the Aristolochia genus, its chemical constituents, and biological and therapeutic activities.

2. Materials and Methods

2.1. Nature of the Research

The study was conducted following the principles of scientometrics, a research model applied based on bibliographic research, which relies on both qualitative and quantitative assessment of scientific production in a specific area of study. According to Ávila-Robinson & Sengoku (2017), this methodology allows for the mapping of scientific literature using metrics, visual analyses, and indicators that delineate relevant patterns and trends, providing a critical reflection, and new insights can be observed, potentially identifying unexplored issues or gaps that may lead to new research and discoveries (Do Carmo et al., 2023).

2.2. Search Strategies and Information Sources

Initially, a search was conducted across different databases, including Google Scholar, PubMed, Science Direct, Scopus, and Web of Science, using the keywords: "Aristolochiaceae, Aristolochia, use." However, the Science Direct database was utilized. Inclusion criteria, such as the publication period between 2013 and 2023, were adopted to refine the search, selecting relevant open-access articles on the topic. The research objectives determine inclusion and exclusion criteria and should be explicitly defined, ensuring a more objective conduct of the study (Patino & Ferreira, 2018; Peters et al., 2020).

2.3. Data Treatment

Data were collected from the selected articles and compiled using Excel 2019 software.

3. Result and Discussion

The data analysis revealed a fluctuation in the number of articles published on the Aristolochiaceae family from 2013 to 2023. An ascending trend in the number of articles was observed between 2013 and 2015, followed by a slight reduction in published studies. Notably, there was a resurgence in 2021 (Figure 1). Variability was also noted in the number of review articles during the sample period, with a gradual increase observed. These trends likely stem from the current interest, particularly in research, for discovering new bioactive molecules within medicinal plants, suggesting a significant potential for Aristolochiaceae family plants in herbal medicine. Furthermore, the rise in the number of studies may be associated with investigations into the effectiveness of the traditional use of these plants, grounded in popular knowledge.

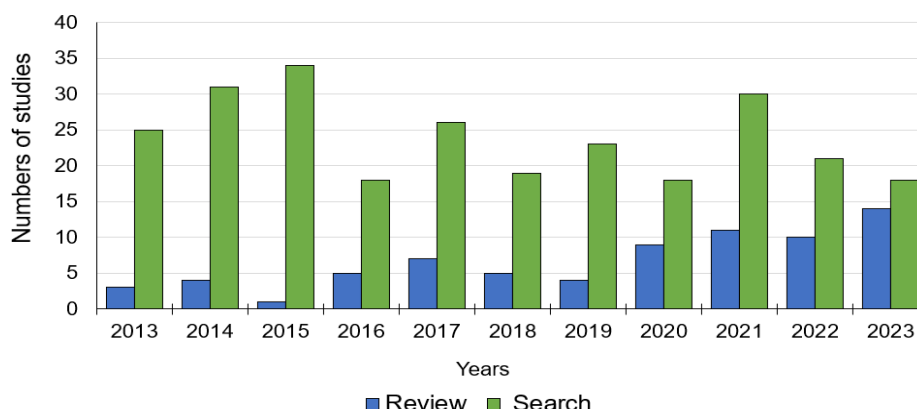


Figure 1. Analysis of the landscape of studies published on the Aristolochiaceae family from 2013 to 2023.

The quest for scientific validation of empirical knowledge related to the use of medicinal plants has spurred the undertaking of new studies, aiming for a deeper understanding of the efficacy of these plants in medicinal practice (Gumisiriza et al., 2021). This hybrid approach, combining laboratory research with traditional wisdom, signifies a positive trend toward a science more open to interdisciplinary collaboration and the appreciation of accumulated knowledge over time (Jansen et al., 2021). According to Yebouk et al. (2020), ethnobotanical knowledge plays a significant role in the development of these studies. This approach seeks to foster greater synergy between contemporary scientific evidence and ancestral wisdom, thus providing a more comprehensive and holistic overview in the field of medicinal plant utilization.

From 2013 to 2023, it was observed that 76% of the total analyzed publications were research articles, while 24% were literature reviews (Figure 2A). Regarding review articles, 64% were found to be restricted access, and 36% were open access (Figure 2B). For research articles, the majority, approximately 70%, were restricted access, with 30% being open access (Figure 2C). The high rate of restricted access articles may be directly related to new research and possibly the identification of novel biomolecules in *Aristolochia* genus plants or the discovery of new species.

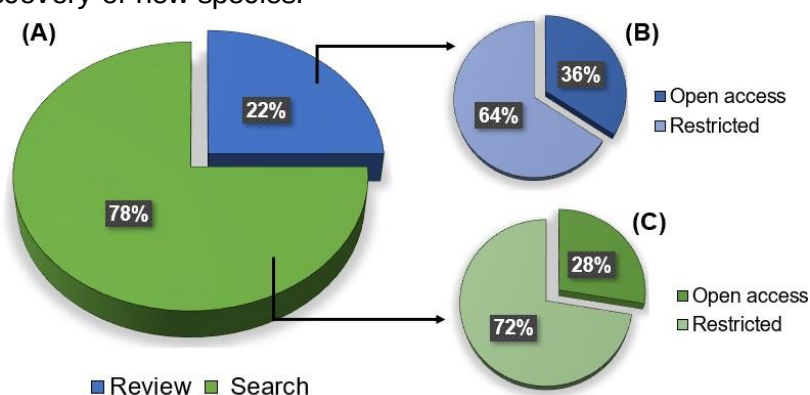


Figure 3. Analysis of review and research articles published on the genus *Aristolochia* from 2013 to 2023. Source: Compiled by the authors using research data, depicting the total number of review and research articles for the period (A); published open access and restricted access review articles (B); and published open access and restricted access research articles (C).

In recent decades, there has been a growing body of studies to understand the mechanisms of action of toxic compounds in *Aristolochia* species (Fernandes, 2021). Kuo et al. (2012) report the chemical composition of 18 *Aristolochia* plant species, revealing a plethora of secondary metabolites, including over 16 chemical groups such as aristolochic acids and derivatives, alkaloids, coumarins, steroids, quinolines, terpenoids, lignans, and flavonoids (Alois et al., 2022; Mariyammal et al., 2023; Teixeira et al., 2023).

Furthermore, specific *Aristolochia* species hold economic importance due to the presence of secondary metabolites and widespread use in traditional communities. Tian et al. (2023) emphasize a considerable variability of metabolites in these plants, with each *Aristolochia* species potentially possessing distinct medicinal properties. However, some species in this genus are known to contain compounds like aristolochic acids, characteristic of the genus (Lukinich-Gruia et al., 2022), which may be linked to adverse health effects; nevertheless, these compounds might have other applications with lower risk (Ang et al., 2021). Additionally, phenolic compounds, flavonoids, alkaloids, and terpenes found in some plants have demonstrated beneficial effects with promising biological activities (Sulyman et al., 2016).

Phenolic compounds constitute a group of antioxidants derived from a simple phenol

molecule, resulting in substances with varying degrees of biological utility (Benmehdi et al., 2017). Furthermore, the concentration of these compounds can be influenced by various factors, such as plant species, season, cultivation conditions, soil, and storage (Aigbe et al., 2018; Olszowy, 2019). Flavonoids, forming a subgroup of phenolic compounds present in fruits and vegetables, encompass various variations, including flavonols, isoflavones, chalcones, flavones, flavanones, catechins, and anthocyanins (Benmehdi et al., 2017). These compounds can ability to engage in scavenging and chelating activities against free radicals, potentially influencing the formation of free radicals themselves (Adjimani & Asare, 2015).

Aristolactam-type alkaloids and derivatives of aristolochic acid are widely distributed in all *Aristolochia* plants. Aristolactam is an intermediate in the biosynthetic pathway of aristolochic acid (Liu & Zhang, 2020). The unique chemical structure of aristolochic acids found in plants of this genus shares common biological properties among different *Aristolochia* species (Rodríguez et al., 2020). Hence, aristolactam-type alkaloids and derivatives of aristolochic acids exhibit distinctive characteristics enough to be considered unique to a specific genus, potentially serving as phytochemical markers for identification and characterization of the genus, as highlighted by Ji et al. (2023).

Moreover, given the diversity of compounds and properties, studies have employed extracts from different solvents to extract metabolites from various plant parts, which may exhibit distinct properties depending on the concentration and diversity of secondary metabolites. Thus, each plant part may have a distinct biological and therapeutic application, as demonstrated in Table 1.

Table 1. Analysis of the diverse biological and therapeutic activities attributed to different parts of *Aristolochia* genus plants.

Plant Part	Biological and Therapeutic Activities	Reference
Leafs	- Hepatic treatment ¹	¹ Koriem et al. (2014)
	- Cancer treatment ²	² Taïbi et al. (2020)
	- Bactericidal ³	³ Steffy et al. (2018)
	- Treatment of snake bites ⁴	⁴ Venkatachalapathi et al. (2018)
	- Healing agent ⁵	⁵ Bolla et al. (2019)
Roots	- Therapeutic potential in 42roper treatment ¹	¹ Akindele et al. (2015)
	- Snakebite ²	² Sarkhel (2014)
	- Potential antioxidant ³	³ Benmehdi et al. (2017)
	- Edema treatment ⁴	⁴ Aigbe et al. (2018)
	- Treatment of menstrual disorders ⁵	⁵ Balamurugan et al (2018)
	- Antimalarial ⁶	⁶ Oyeyemi et al. (2019)
Stems	-	
	Antimyotoxic potential. ¹	¹ Rodríguez et al. (2020)
	- Snakebite ²	² Sarkhel (2014)

Source: Developed by the authors.

The extracts and the bioactive compounds from *Aristolochia* species have been extensively explored in the pharmacological properties and traditional medicine in property rope (Bolla et

al., 2019). Species belonging to the *Aristolochia* genus are popularly used due to their property of biological properties and high therapeutic potential. Despite the evidence of population usage, developing more specific studies for each species is necessary, as each may exhibit distinct actions (Giovannini & Howes, 2017). Therefore, for a medicinal plant to be considered safe, especially for producing herbal medicines, it is crucial to address various aspects, starting from widespread knowledge, ethnopharmacological studies, and toxicity assessments.

4. Final considerations

The comprehensive analysis of the landscape of studies on the Aristolochiaceae family from 2013 to 2023 reveals a complex and promising scenario. The relevance of medicinal plant use persists, demonstrating the ongoing transmission of therapeutic knowledge across different generations in traditional communities.

However, the scarcity of studies on the composition of bioactive molecules and toxicity of *Aristolochia* plants underscores the need for more in-depth research. The high percentage of research articles with restricted access suggests significant potential for recent discoveries and identifying novel biomolecules.

The diversity of secondary metabolites in different plant parts highlights the potential applicability of these plants. The emphasis on widespread knowledge reinforces the importance of understanding the scientific aspects and the cultural and traditional contexts associated with using these plants.

Nevertheless, there remains a continuous need for collaborative research, with a focus on accessible herbal studies, to expand understanding of the therapeutic potential and challenges associated with the use of *Aristolochia* (Aristolochiaceae) medicinal plants. New studies could be directed towards applications of the bioactive constituents of these plants, contributing to the safe and effective use of these natural resources, benefiting both traditional communities and the global scientific community.

Acknowledgement

Gratitude to the Graduate Program in Health Sciences, UFGD, the Letox-Ufgd research group, and the Foundation for Support to the Development of Teaching, Science, and Technology of the State of Mato Grosso do Sul (FUNDECT, Brazil; PDPG No. 18/2020), the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq, Brazil; No. 407685/2018-9), and the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES, Brazil) for their financial support and scholarship granted to the author.

5. References

- Adjimani JP, & Asare P 2015. Antioxidant and free radical scavenging activity of iron chelators. *Toxicology reports*, 2, 721-728.
- Aigbe FR, Munavvar ASZ, Rathore H, Eseyin O, Pei YP, Akhtar S, ... & Johns E 2018. Alterations of haemodynamic parameters in spontaneously hypertensive rats by *Aristolochia ringens* Vahl. (Aristolochiaceae). *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 8(1), 72-80.
- Akindele AJ, Wani Z, Mahajan G, Sharma S, Aigbe FR, Satti N, ... & Mondhe D M 2015. Anticancer activity of *Aristolochia ringens* Vahl. (Aristolochiaceae). *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 5(1), 35-41.
- Ali B, Al-Wabel NA, Shams S, Ahamad A, Khan SA, & Anwar F 2015. Essential oils used in aromatherapy: A systemic review. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 5(8), 601-611.
- Alois KM, Sangiwa GC, Marciale CM, & Sahini, MG 2022. Phytochemical constituents and larvicidal efficacy of leaf extracts of *Aristolochia elegans* (Aristolochiaceae). *South African Journal of Botany*, 146, 383-394.
- Anand U, Tudu CK, Nandy S, Sunita K, Tripathi V, Loake GJ, ... & Proćków J 2022. Ethnodermatological use of medicinal plants in India: From ayurvedic formulations to clinical perspectives—A review. *Journal of Ethnopharmacology*, 284, 114744.
- Ang LP, Ng PW, Lean YL, Kotra V, Kifli N, Goh HP, ... & Ming LC 2021. Herbal products containing aristolochic acids: A call to revisit the context of safety. *Journal of Herbal Medicine*, 28, 100447.
- Arias DMR, Cevallos D, Gaoue OG, Fadiman MG, & Hindle T 2020. Non-random medicinal plants selection in the Kichwa community of the Ecuadorian Amazon. *Journal of Ethnopharmacology*, 246, 112220.
- Ávila-Robinson A, & Sengoku S 2017. Tracing the knowledge-building dynamics in new stem cell technologies through techno-scientific networks. *Scientometrics*, 112(3), 1691-1720.
- Aziz MA, Khan AH, Adnan M, & Izatullah I 2017. Traditional uses of medicinal plants reported by the indigenous communities and local herbal practitioners of Bajaur Agency, Federally Administrated Tribal Areas, Pakistan. *Journal of Ethnopharmacology*, 198, 268-281.
- Balamurugan S, Vijayakumar S, Prabhu S, & Yabesh JM 2018. Traditional plants used for the treatment of gynaecological disorders in Vedaranyam taluk, South India-An ethnomedicinal survey. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 8(2), 308-323.
- Benmehdi H, Behilil A, Memmou F, & Amrouche A 2017. Free radical scavenging activity, kinetic behaviour and phytochemical constituents of *Aristolochia clematitis* L. roots. *Arabian Journal of Chemistry*, 10, S1402-S1408.
- Bolla SR, Al-Subaie AM, Al-Jindan RY, Balakrishna JP, Ravi PK, Veeraraghavan VP, ... & Surapaneni KM 2019). In vitro wound healing potency of methanolic leaf extract of *Aristolochia saccata* is possibly mediated by its stimulatory effect on collagen-1 expression. *Heliyon*, 5(5).

Boy HIA, Rutilla AJH, Santos KA, Ty AMT, Alicia IY, Mahboob T, ... & Nissapatorn V 2018. Recommended medicinal plants as source of natural products: a review. *Digital Chinese Medicine*, 1(2), 131-142.

Choudhury A, Singh PA, Bajwa N, Dash S, & Bisht P 2023. Pharmacovigilance of herbal medicines: Concerns and future prospects. *Journal of Ethnopharmacology*, 116383.

Da Silva MG, Furtado MM, Osório AT, Da Silva Morais ICP, Do Amaral MPM, Coêlho AG, & Arcanjo DDR 2021. A importância dos ensaios de toxicidade para o desenvolvimento e o registro de fitoterápicos no Brasil. *Research, Society and Development*, 10(12), e538101220137-e538101220137.

De Castro MR, & Figueiredo FF 2020. Estudos e pesquisas sobre o uso de plantas medicinais e fitoterápicas no Brasil: caminhos e desafios. *Ar@cne. Revista Electrónica de Recursos en Internet sobre Geografía y Ciencias Sociales*, 240, 1-20.

De Medeiros PM, Dos Santos GMC, Barbosa DM, Gomes LCA, Santos ÉMDC, & Da Silva RRV 2021). Local knowledge as a tool for prospecting wild food plants: experiences in northeastern Brazil. *Scientific Reports*, 11(1), 594.

Dhole PA, Bhogaonkar PY, Chavhan VN, & Kshirsagar PP 2021. Some ethnomedicinal plants from Amravati district (MS) India. *International Journal of Advanced Research in Biological Sciences*, 8(1), 65-71.

Do Carmo G, Felizardo LF, De Castro Alcântara V, Da Silva CA, & Do Prado JW 2023. The impact of Jürgen Habermas's scientific production: a scientometric review. *Scientometrics*, 128(3), 1853-1875.

Fernandes JM, Silva DF, Lopes CRAS, De Almeida AASD, Braga JMA, Freitas J, & González F 2021. Contribuição à taxonomia do gênero *Aristolochia* (Aristolochiaceae) no Estado de Mato Grosso, com uma nova ocorrência para o Brasil. *Research, Society and Development*, 10(10), e518101018676-e518101018676.

Freitas J, Lirio EJ, Barros F, & González F 2020. Aristolochiaceae in Flora do Brasil. *Jardim Botânico do Rio de Janeiro*. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB15766>>. Acesso em: 11/01/2024.

Giovannini P, & Howes MJR 2017. Medicinal plants used to treat snakebite in Central America: Review and assessment of scientific evidence. *Journal of Ethnopharmacology*, 199, 240-256.

Gittelman M 2016. The revolution re-visited: Clinical and genetics research paradigms and the productivity paradox in drug discovery. *Research Policy*, 45(8), 1570-1585.

Guido PC, Ribas A, Gaioli M, Quattrone F, & Macchi A 2015. The state of the integrative medicine in Latin America: The long road to include complementary, natural, and traditional practices in formal health systems. *European Journal of Integrative Medicine*, 7(1), 5-12.

Gumisiriza H, Sesaazi CD, Olet EA, Kembabazi O, & Birungi G 2021. Medicinal plants used to treat "African" diseases by the local communities of Bwambara sub-county in Rukungiri District, Western Uganda. *Journal of Ethnopharmacology*, 268, 113578.

Hill RA 2022. Making Scientific Sense of Traditional Medicine: Efficacy, Bioprospecting, and the Enduring Hope of Drug Discovery in Ethiopia. *History of Pharmacy and Pharmaceuticals*,

63(2), 270-301.

Jaiswal YS, & Williams LL 2017. A glimpse of Ayurveda–The forgotten history and principles of Indian traditional medicine. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 7(1), 50-53.

Jamal A 2023. Embracing nature's therapeutic potential: herbal medicine. *International Journal of Multidisciplinary Sciences and Arts*, 2(1), 117-126.

Jansen C, Baker JD, Kodaira E, Ang L, Bacani AJ, Aldan JT, ... & Adra CN 2021. Medicine in motion: Opportunities, challenges and data analytics-based solutions for traditional medicine integration into western medical practice. *Journal of Ethnopharmacology*, 267, 113477.

Ji H, Zhang G, & Zhou X 2023. Rapid simultaneous determination of thirteen aristolochic acids analogs in Aristolochiaceae plants by Ultra-High-Performance liquid Chromatography-tandem mass spectrometry in dynamic multiple reaction monitoring mode. *Journal of Chromatography B*, 1225, 123753.

Kar DR, Ghosh P, Suresh P, Chandra S, & Paul D 2022. Review on Phyto-chemistry & pharmacological activity of *Melia azedarach*. *International Journal of Experimental Research and Review*, 28, 38-46.

Koriem KM, Shahabudin RE, & Jamaludin RZ 2014. *Aristolochia gehrtii* inhibits liver toxicity and apoptosis in *Schistosoma malayensis* infection. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 7(9), 685-692.

Kurek M, Benaïda-Debbache N, Elez Garofulić I, Galić K, Avallone S, Voilley A, & Waché Y 2022. Antioxidants and bioactive compounds in food: Critical review of issues and prospects. *Antioxidants*, 11(4), 742.

Liaqat A, Zahoor T, Atif Randhawa M, & Shahid M 2019. Characterization and antimicrobial potential of bioactive components of sonicated extract from garlic (*Allium sativum*) against foodborne pathogens. *Journal of Food Processing and Preservation*, 43(5), e13936.

Liu R, & Zhang HC 2020. Chemical constituents from *Aristolochia tagala* and their chemotaxonomic significance. *Biochemical Systematics and Ecology*, 90, 104037.

Lukinich-Gruia AT, Nortier J, Pavlović NM, Milovanović D, Popović M, Drăghia L P, ... & Tatu CA 2022. Aristolochic acid I as an emerging biogenic contaminant involved in chronic kidney diseases: A comprehensive review on exposure pathways, environmental health issues and future challenges. *Chemosphere*, 297, 134111.

Mariyammal V, Sathiageetha V, Amalraj S, Gurav SS, Amiri-Ardekani E, Jeeva S, & Ayyanar M 2023. Chemical profiling of *Aristolochia tagala* Cham. leaf extracts by GC-MS analysis and evaluation of its antibacterial activity. *Journal of the Indian Chemical Society*, 100(1), 100807.

Mueller LP, De Aquino DVBS, Garcia LC, Tanaka LHV, Bachega TG, De Sousa Maia AM, ... & Oesterreich SA 2022. The *Aristolochia* (Aristolochiaceae) genus: therapeutic properties, biological effects and toxicity. *Research, Society and Development*, 11(11), e293111133504-e293111133504.

Nascimento DSD, Cervi AC, & Guimarães OA 2010). A família Aristolochiaceae Juss. no estado do Paraná, Brasil. *Acta Botanica Brasilica*, 24, 414-422.

Nikesh VV, & Maddi EG 2023. Traditional and Herbal Malaria Treatment in Africa: An Ethnobotanical Analysis. *Journal of Coastal Life Medicine*, 11, 117-122.

Olszowy M 2019. What is responsible for antioxidant properties of polyphenolic compounds from plants?. *Plant Physiology and Biochemistry*, 144, 135-143.

Oyeyemi IT, Akinseye KM, Adebayo SS, Oyetunji MT, & Oyeyemi OT 2019. Ethnobotanical survey of the plants used for the management of malaria in Ondo State, Nigeria. *South African Journal of Botany*, 124, 391-401.

Panossian AG, Efferth T, Shikov AN, Pozharitskaya ON, Kuchta K, Mukherjee PK, ... & Wagner H 2021. Evolution of the adaptogenic concept from traditional use to medical systems: Pharmacology of stress-and aging-related diseases. *Medicinal Research Reviews*, 41(1), 630-703.

Patino CM, & Ferreira JC 2018. Inclusion and exclusion criteria in research studies: definitions and why they matter. *Brazilian Journal of Pulmonology*, 44, 84-84.

Pereira AO, Avila JM, Do Carmo G, Siqueira FS, Campos MM, Back DF, ... & Dalcol II 2018. Chemical composition, antimicrobial and antimycobacterial activities of *Aristolochia triangularis* Cham. from Brazil. *Industrial Crops and Products*, 121, 461-467.

Peters MD, Marnie C, Tricco AC, Pollock D, Munn Z, Alexander L, ... & Khalil H 2020. Updated methodological guidance for the conduct of scoping reviews. *JBIC Evidence Synthesis*, 18(10), 2119-2126.

Rodríguez IIG, Francisco AF, Moreira-Dill LS, Quintero A, Guimarães CL, Fernandes CA, ... & Soares AM 2020. Isolation and structural characterization of bioactive compound from *Aristolochia sprucei* aqueous extract with anti-myotoxic activity. *Toxicon*: X, 7, 100049.

Sarkhel S 2014. Ethnobotanical survey of folklore plants used in treatment of snakebite in Paschim Medinipur district, West Bengal. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 4(5), 416-420.

Silva MSC, & De Melo Guedes JP 2022. Segurança no uso de plantas medicinais e fitoterápicos durante a gestação. *Research, Society and Development*, 11 (7), e4611729431-e4611729431.

Steffy K, Shanthi G, Maroky AS, & Selvakumar S 2018. Enhanced antibacterial effects of green synthesized ZnO NPs using *Aristolochia indica* against Multi-drug resistant bacterial pathogens from Diabetic Foot Ulcer. *Journal of Infection and Public Health*, 11(4), 463-471.

Sulyman AO, Akolade JO, Sabiu SA, Aladodo RA, & Muritala HF 2016. Antidiabetic potentials of ethanolic extract of *Aristolochia ringens* (Vahl.) roots. *Journal of Ethnopharmacology*, 182, 122-128.

Taïbi K, Abderrahim LA, Ferhat K, Betta S, Taïbi F, Bouraada F, & Boussaid M 2020. Ethnopharmacological study of natural products used for traditional cancer therapy in Algeria. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 28(11), 1451-1465.

Teixeira AM, Gomes PWP, Da Silva FA, Gomes PWP, Murgu M, & Borges RM 2023. Reverse ethnopharmacological-guided study of *Aristolochia trilabiata* leaves-unveiling its antioxidant potential and chemical profile. *South African Journal of Botany*, 161, 1-11.

Tian J, Liu C, Wang L, Xian Z, Zhao Y, Qin S, ... & Liang A 2023. Study on the difference and correlation between the contents and toxicity of aristolochic acid analogues in *Aristolochia* plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 315, 116568.

Tuama AA, & Mohammed AA 2019. Phytochemical screening and in vitro antibacterial and anticancer activities of the aqueous extract of *Cucumis sativus*. Saudi Journal of Biological Sciences, 26(3), 600-604.

Ünlüyol D, Gökçekuş H, Kassem Y, Tezer M, Meriçli F, & Yavuz DÖ 2023. Complementary and Alternative Medicines in Northern Cyprus: Public Awareness, Patterns of Use, and Attitudes. In Healthcare, 11(7): 977.

Van Wyk AS, & Prinsloo G 2020. Health, safety and quality concerns of plant-based traditional medicines and herbal remedies. South African Journal of Botany, 133, 54-62.

Van Wyk BE 2020. A family-level floristic inventory and analysis of medicinal plants used in Traditional African Medicine. Journal of Ethnopharmacology, 249, 112351.

Vaou N, Stavropoulou E, Voidarou C, Tsigalou C, & Bezirtzoglou E 2021. Towards advances in medicinal plant antimicrobial activity: A review study on challenges and future perspectives. Microorganisms, 9(10), 2041.

Venkatachalapathi A, Sangeeth T, Ali MA, Tamilselvi, SS, Paulsamy S, & Al-Hemaidc FM 2018. Ethnomedicinal assessment of Irula tribes of Walayar valley of Southern Western Ghats, India. Saudi journal of biological sciences, 25(4), 760-775.

WHO - World Health Organization. Global report on traditional and complementary medicine 2019. World Health Organization [Internet]. 2019. Available from: <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/312342/9789241515436-eng.pdf?sequence=1>. Acesso em 12 de janeiro de 2024.

Yebouk C, Redouan FZ, Benítez G, Bouhbal M, Kadiri M, Boumediana AI, ... & Merzouki A 2020. Estudo etnobotânico de plantas medicinais na província de Adrar, Mauritânia. Jornal de Etnofarmacologia, 246, 112217.

Zazouli S, Chigr M, Ramos PA, Rosa D, Castro MM, Jouaiti A, ... & Silvestre AJ 2022. Chemical profile of lipophilic fractions of different parts of *Zizyphus lotus* L. by GC-MS and evaluation of their antiproliferative and antibacterial activities. Molecules, 27(2), 483.

Artigo2: Este trabalho deu origem ao artigo: Evaluation of the Acute Toxicity and Toxicogenetic Effects of the Aqueous Extract from the Stems of *Aristolochia ridicula* que após versão final e revisão do Inglês será submetido no periódico escolhido.

A ser submetido: Revista Journal of Ethnopharmacology (Qualis A2 na área de Medicina II)

Link com as normas da revista.

<https://www.sciencedirect.com/journal/journal-of-ethnopharmacology/publish/guide-for-authors>

Evaluation of the Acute Toxicity and Toxicogenetic Effects of the Aqueous Extract from the Stems of *Aristolochia ridicula*

Laís Chancare Garcia^a, Larissa Pires Mueller^a, Dioelen Virgínia Borges de Aquino Coelho^b, Claudio Rodrigues Nogueira^a, Silvia Aparecida Oesterreich^a

^a *Faculty of Health Sciences, Federal University of Grande Dourados, Dourados, Mato Grosso do Sul, Brazil*

^b *State University of Mato Grosso do Sul, Dourados, Mato Grosso do Sul, Brazil*

^a Faculty of Health Sciences, Federal University of Grande Dourados, Dourados, Dourados-Itahum Highway, Km 12, University City, P.O. Box 364m, ZIP Code 79804-970, Phone +55 67 3410-2001 (laisgarcianutri@gmail.com; larissapiresmueller@gmail.com; claudiornogueira@ufgd.edu.br; silviaoesterreich@ufgd.edu.br)

^b State University of Mato Grosso do Sul, BR 163, Km 12, ZIP Code 79904-970, Dourados – MS, Phone +55 67 3902-2362 (dioelen.coelho@uems.br)

Abstract

Ethnopharmacological relevance: *Aristolochia ridicula* (jarrinha) is a common species native to South America, used in traditional medicine for treating pulmonary diseases, anti-inflammatory, antidiarrheal, and digestive purposes. Despite the plant's properties, the literature is scarce regarding this species, and there are no records in Brazil validating its safe use by humans.

Study objective: To assess the acute toxicity and toxicogenetic effects of *Aristolochia ridicula* through the micronucleus test and comet assay.

Materials and methods: The aqueous extract from the *Aristolochia ridicula* (EAAR) stems was used for acute toxicity tests in male and female rats at a single dose of 2000 mg/kg to determine the LD50. Hypochromic screening was also observed for 14 days. Genotoxicity assays were conducted using the micronucleus test and comet assay.

Results: The experiments conducted in this study provide initial evidence of the oral (gavage) toxicity of EAAR, showing that it is not genotoxic to peripheral blood cells. Furthermore, the tests performed do not exhibit clastogenic/aneugenic activity in the bone marrow cells of rats.

Conclusion: The LD50 of EAAR is more significant than 2000 mg/kg, and it does not possess genotoxic potential in peripheral blood cells nor clastogenic and aneugenic activity in bone marrow cells of rats. It is not a mutagenic agent.

Keywords: Micronucleus, comet assay, toxicogenetics, medicinal plant, *Aristolochia*.

1. Introduction

The use of plants for medicinal purposes is a practice known since ancient times and has gained increasing interest and recognition as people seek more natural and alternative healthcare approaches. This trend also reflects the search for disease prevention and health promotion strategies, in addition to the appreciation of the culture of various groups and communities. Throughout history, the use of medicinal plants has been closely intertwined with cultural practices and traditions (Kar et al., 2022; Maciel et al., 2002). Furthermore, therapeutic products derived from plants are a promising pharmaceutical science area (Castro and Albiero, 2016).

In this sense, medicinal plants become an alternative for treating various health problems as the demand for natural alternatives to conventional treatments grows. These can be utilized as infusions, extracts, oils, and syrups. (Heinrich et al., 2009). Furthermore, Brazil is known and recognized for its extraordinary plant biodiversity, being considered one of the country's most prosperous in the variety of plant species. This biological wealth provides an extensive range of biologically active substances with the potential for pharmacological and therapeutic applications (Castro and Figueiredo, 2020).

Given that a significant portion of the population uses medicinal plants empirically based on local knowledge transferred within the community, various factors contribute to this practice. These factors include easy access, low cost, and beliefs passed down through generations (Sarmiento Gadelha et al., 2013). Therefore, the study of bioactive compounds in medicinal plants consumed in Brazil, their pharmacological effects, and potential toxicity becomes relevant (Maciel et al., 2002; Oliveira and Gonçalves, 2007).

Aristolochia ridicula is a plant belonging to the *Aristolochiaceae* family of the *Piperales* order and encompasses 600 species dispersed in temperate zones and predominantly in the tropics. Most species of the *Aristolochia* group occur on the edges of Brazilian forests. They are popularly known as "cipó-de-mil homens," "cipó milomem," "patinho," "papo-de-Peru," "jarrinha," "erva-de-urubu," among others (SiBBr, 2021).

The therapeutic use of various species in this family, including *Aristolochia ridicula*, is attributed to its characteristic chemical composition, with the presence of phenolic compounds, flavonoids, biflavones, chalconaflavones, and tetraflavonoids found in the plant (Machado and Lopes, 2008; Navickiene and Lopes, 2001; Salomé et al., 2020). Among the biological properties that species of the genus have highlighted are their connections to cancer treatment

as reported in experimental studies (Heinrich et al., 2009), pharmacological activities such as antibacterial (Alviano et al., 2008; León-Díaz et al., 2010), insecticidal, antidiarrheal, treatment of snakebites, and digestive properties (Frei et al., 1985; Rodriguez, 2010). They also exhibit anti-inflammatory, antirheumatic, and antispasmodic activities (Messiano et al., 2008; Zhang et al., 2008) and treat lung inflammations and weight loss therapies (Oliveira and Gonçalves, 2007). In experimental chemical studies with the leaves of *A. ridicula*, Machado and Lopes (2008) identified three new flavonoids, including a biflavone, a new chalconaflavone, and a tetraflavonoid—members of a significant group of metabolites belonging to the flavonoid family, which are considered rare compounds.

Given that the occurrence of this compound is atypical and unprecedented in the extract of *A. ridicula*, this plant has become promising in pharmacological science. Previous studies indicate that plants of this genus may exhibit cytotoxic actions, primarily linked to aristolochic acid (AA), known to induce nephropathy and cancer in humans (Han et al., 2019; Kang et al., 2021). However, the literature reports that depending on the extraction method and solution preparation, there may be higher or lower concentrations of AA (Chen, 2020; Li et al., 2018; Wu et al., 2005). Additionally, there is conflicting information in the literature regarding the effects of AA in humans, emphasizing the need for detailed studies on the subject (Zhou et al., 2019). There are few studies on *A. ridicula*, especially in Brazil, addressing both clinical toxicity and toxicogenetic aspects, which could provide information on its safe consumption.

Thus, the research aimed to assess the acute toxicity and toxicogenetic potential of the aqueous extract from the stems of *Aristolochia ridicula* through the micronucleus test and comet assay in Wistar rats.

2. Materials and Methods

2.1 Plant identification and extract preparation

The stems of *A. ridicula* were collected in the garden of medicinal plants of the Federal University of Grande Dourados, in Dourados, MS, Brazil (22°09'16.3"S 54°48'17.8"W) and stored in a freezer at - 20 °C. Access register SisGen/MMA number: AE2A578.

The stems of *A. ridicula* were dried in an air-circulated oven at 50°C for 72 hours. Following the drying process, the material was ground using a semi-industrial processor until a powdered texture was obtained, and it was stored in a dry environment at 25°C. The aqueous extract of *A. ridicula* stems (EAAR) was prepared by mixing the dried and powdered material with distilled water. After homogenization, decoction was performed, followed by filtration.

The obtained filtrate was frozen at -80°C. The lyophilized extract was used in the experiments.

2.2 Animals and Treatments

Thirty Wistar rats (*Rattus norvegicus*) of both sexes (30 males and 30 females), aged 6 to 9 weeks, were used in the study. The animals were provided by the Central Vivarium of UFGD and housed in rodent-specific cages (49x34x16cm), with 5 animals per cage, under controlled conditions of temperature ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$) and humidity (40-60%), with ad libitum access to water and standard rodent chow. Experimental procedures followed ethical principles for using animals in research and were approved by the Ethics Committee for Animal Use at UFGD (protocol n°. 15/2021).

For acute toxicity, two groups of males and females (n=5 each) were established and treated with a single oral dose of 2000mg/kg of EAAR via gavage. Two additional groups of 5 males and 5 females were established: 1) negative control group, treated with filtered distilled water orally; 2) positive control group, treated with 50mg/kg of body weight of cyclophosphamide monohydrate, administered intraperitoneally 24 hours before eutanásia.

2.3 Acute toxicity

Acute toxicity was assessed following the OECD protocol (2008) Acute oral toxicity - up and down procedure. After administration, the animals were closely monitored during the first 24 hours, at intervals of 15, 30, and 60 minutes, and then every 4 hours, followed by once a day for 14 consecutive days (OECD, 2022).

During the study period, general toxic signs were observed according to the Hippocratic screening (Malone and Robichaud, 1962), evaluating the following parameters: body weight variation, clinical signs (piloerection, writhing, tremors, seizures, cyanosis, ataxia, diarrhea), and behavioral signs. Physiological data (body weight, water, and food consumption) were observed and recorded daily. Additionally, mortality was observed to estimate the lethal dose for 50% of the animals (LD50).

On the 15th day, animals were euthanized with an overdose of anesthetics, confirming death through the absence of corneal reflex. After death confirmation based on vital signs and corneal reflex analysis, vital organs (heart, lung, liver, right kidney, spleen, right ovary, uterus, right testicle, and epididymis) were collected, weighed, and macroscopically analyzed. Any alterations in the organs' general appearance, color, and texture were noted for subsequent

histopathological analysis.

2.4 Micronucleus Test

The micronucleus test was conducted following the guidelines of the Organisation for Economic Cooperation and Development (OECD, 2016). Analyses of polychromatic erythrocytes were performed using cells obtained from the bone marrow of treated animals.

Immediately after euthanasia, the right femur of each animal was removed and separated from adjacent muscles. Both ends of the femur were cut, and the bone marrow was washed with 1 mL of fetal bovine serum and immediately placed in a microtube for centrifugation. After 5 minutes of centrifugation at 1000 rpm, the supernatant was discarded, and the pellet was used to prepare slides. The slides were fixed in methanol for 10 minutes and stained with Giemsa for 15 minutes. For each sample, 2000 erythrocytes were analyzed to identify micronucleated polychromatic erythrocytes (indicative of genotoxic damage).

The ratio of polychromatic erythrocytes (PCEs) to normochromatic erythrocytes (NCEs) was also calculated. This cytotoxicity assay assesses whether the test substance causes toxic effects on erythrocytes originating from the bone marrow. To evaluate the cytotoxicity of EAAR, 1000 NCEs were counted along with the frequency of PCEs in the same microscopic field. The indication of cytotoxic damage occurs when the ratio is closer to 0, while a ratio close to 1 indicates no cytotoxic damage (Schmid, 1976).

2.5 Comet Assay

The Comet Assay was performed using peripheral blood analysis following the OECD guidelines (OECD, 2014) and the modifications outlined in Mueller et al. (2019). Before euthanasia, each animal was anesthetized with a combination of ketamine and xylazine. A small cut at the tip of the tail was made for blood collection, which was then inserted into pre-coated agarose slides. Subsequently, the slides were kept in lysis solution for 2 hours to remove the cell membrane and allow DNA leakage. The slides with leaked DNA were placed in an electrophoresis tank, immersed in an alkaline solution, and subjected to electrophoresis for 20 minutes at a temperature of -4°C, 25V, and 300mA. After electrophoresis, the slides were placed in a neutralization solution for 3 cycles of 5 minutes each. Following that, they were fixed with absolute alcohol for 10 minutes and refrigerated in the dark. The slides were stained with silver nitrate and examined under an optical microscope at 400x magnification for analysis.

For analysis, 100 nucleoids were randomly selected by optical microscopy and categorized into five levels of damage (0, 1, 2, 3, 4) based on the intensity and pattern of drag of

degraded genetic material, where 0 indicates the lowest level of degradation and 4 the highest (Møller, 2018). The DNA Damage Index (DDI) was calculated following the methodology of Fernandes, Bustos-Obregon & Salvatori (2015).

2.6 Statistical Analysis

In the *in vivo* comet and micronucleus assays, the data were expressed as mean $\pm$ standard error of the mean (SEM). Differences between groups were assessed using analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's post hoc test. For acute toxicity assays, differences were evaluated using an unpaired t-test. A p-value < 0.05 was considered statistically significant. Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 9.0 software.

3. Results

3.1 Acute Toxicity

After exposure to the dose of 2000mg/kg of EAAR, there was no mortality among the studied animals. Additionally, according to the Hippocratic screening, male and female animals treated with EAAR did not show clinical signs of toxicity or behavioral changes during the entire study period. The average weight ranged between 311.6 ± 4.58 and 212.4 ± 4.75 ($p < 0.05$) for the negative control group and 317.8 ± 2.41 and 225.4 ± 3.23 ($p < 0.05$) for the treated group. The groups had no significant changes in weight gain, water consumption, and food consumption (Table 1).

No macroscopic alterations were observed when analyzing vital organs, and no changes were found in the histopathological analysis. There were no differences in organ weights between the groups, except for testicle size, where there was a statistical difference in the treated group compared to the negative control group (Table 2).

3.2 Micronucleus Test

Table 3 shows the difference between the means of micronucleated polychromatic erythrocytes (MN-PCEs) in all experimental groups. Both male and female animals in the positive control group had an increase in the number of MN-PCEs compared to the negative control group. Statistical analysis revealed that there was no statistical difference in the groups that received EAAR (both males and females), exhibiting similar means to those observed in the negative control. Regarding the PCE/NCE ratio, statistical analysis showed that EAAR

treatment did not cause any significant changes compared to the negative control, with means that only differed from those observed in the positive control group.

3.3 Comet Assay

Regarding the Comet assay results, statistical analysis showed an increase in damage classes I and II in males and females of the EAAR group compared to the negative control group. The number of damaged cells and the DNA Damage Index (DDI) in the negative control group and the groups treated with EAAR were lower than the positive control, with significant statistical differences (Table 4).

4. Discussion

This study is the first to assess the acute toxicity, genotoxic, and mutagenic potential of *Aristolochia ridicula* stems.

Clinical toxicity studies are conducted to evaluate safe doses for using a specific plant species, and one of these tests is acute toxicity, currently regulated by the Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) guideline 425. This guideline determines the median lethal dose through single or multiple exposures to the test substance at its highest dose in vivo, usually with rodents, over a short period (OECD, 2022).

Systemic toxicity can be classified by defined clinical and physiological signs based on the reduction in the experimental animals' body mass. Additionally, reduced ponderal development, decreased water and food consumption, as well as behavioral changes such as prostration, apathy, and poor coat condition, are also considered essential signs of toxicity from a specific substance (Castro et al., 2005; Silva et al., 2005). Furthermore, signs of toxicity may be expressed through changes in the mass of vital organs (Hiremath et al., 1997). Such situations were not evident in this study, as there was no reduction in body weight or alteration in the feed consumption by treated animals, which showed weight gain similar to that of the control group.

This study is the first to assess the acute toxicity, genotoxic, and mutagenic potential of *Aristolochia ridicula* stems.

Clinical toxicity studies are conducted to evaluate safe doses for using a specific plant species, and one of these tests is acute toxicity, currently regulated by the Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) guideline 425. This guideline determines the median lethal dose through single or multiple exposures to the test substance at its highest

dose in vivo, usually with rodents, over a short period (OECD, 2022).

Regarding the weight of vital organs, only the testicle showed a significant difference in weight, which was lower than that of the negative control group. However, the found averages are within the normal range for the animal species (Castro et al., 2005; Mello et al., 2004).

EAAR proved to have low toxicity, evidenced by the absence of mortality in the evaluated animals and the lack of behavioral and physiological changes throughout the study period. These findings are consistent with data on acute toxicity studies with plants of the genus (Veloso, 2019). Araujo (2021) evaluated the acute toxicity of the aqueous extract of *A. triangularis*, and there were no deaths in animals treated with the extract at a dose of 2000 mg/kg within 14 days, nor were there behavioral changes. According to Traesel et al. (2014), a substance that does not cause lethality, deaths, or behavioral changes at a dose of 2.0 g/kg demonstrates a toxicological nature of class 5 ($LD_{50} > 2000$ mg/kg), showing improbable toxicity.

The field of toxicological genetics aims to contribute to the identification of chemical or natural agents capable of causing alterations in DNA in somatic or germ cells, which can be permanent in descendants through malformations and even in tumor formation (Düsman et al., 2012; Fonseca and Pereira, 2013). To identify such agents and classify them as genotoxic or not, there is a range of in vitro and in vivo assays, such as the comet assay and the micronucleus test, which are commonly used in pre-clinical trials and provide relevant and reliable information (Sales et al., 2017).

The comet assay detects direct damage to genetic material caused by genotoxic agents, whether synthetic or derived from medicinal plants (Ribeiro et al., 2003). Genotoxicity is not a measure of carcinogenicity, although it is often used as an indicator of cancer since the method identifies an initial or intermediate event in tumor formation (Araldi et al., 2015).

This study showed that the administration of the extract did not result in genotoxic effects in animals treated with EAAR in the high damage classes, as well as the DNA Damage Index (DDI), which was close to the negative control group. There were statistical differences in all damage classes and the damage index in the EAAR group compared to the positive control group, confirming that the administration of cyclophosphamide in the positive control group resulted in the expected effect.

Another assay performed in this study was the micronucleus test, which has the characteristic of detecting clastogenic agents (capable of breaking chromosomes) and aneugenic agents (inducing abnormal chromosomal segregation) (Flores and Yamaguchi, 2008). The increase in the frequency of micronuclei in polychromatic erythrocytes (MN-PCEs) plays a vital role in identifying the neoplastic development of certain tumors (Fenech, 2000). In this study, EAAR showed no difference in the number of MN-PCEs compared to the negative control. As expected, the group treated with cyclophosphamide presented a high frequency of MN-PCEs.

Moreover, the micronucleus test allows for determining the cytotoxic potential of the test substance through a PCE/NCE ratio in bone marrow cells. Compounds that reduce the production of young (polychromatic) erythrocytes are considered cytotoxic compounds (Ribeiro et al., 2003). This study's findings showed no changes in the MN-PCE and PCE/PCE+NCE parameters compared to the negative control group. There was a statistically significant difference compared to the positive control group. These results indicate that EAAR was not cytotoxic to this cell type and did not have clastogenic/aneugenic effects. Furthermore, a potential cytoprotective effect can be suggested in the group that received EAAR, as they showed a significant increase in the PCE/NCE ratio. This finding can serve as a basis for further studies with EAAR that identify the antigenotoxic effects of the extract.

Dantas (2019) investigated the antimutagenic activity of medicinal plants, and of the species that did not present mutagenic potential, 32% (195/597) showed antimutagenic activity. Thus, Słoczyńska et al. (2014) in their studies reported that natural antioxidants act as the primary sources linked to antimutagenic properties, inferring that the prevention of reactive oxygen species (ROS) before the substance/DNA interaction causes a mutation.

The presence of bioactive compounds such as flavonoids, biflavonoids, and tetraflavonoids, among others found in the plant, suggests that it is a rich source of phenolic and antioxidant compounds (Machado and Lopes, 2008). These compounds can act in the prevention and formation of reactive oxygen species (ROS). However, evidence suggests that cumulative DNA damage caused by ROS can also contribute to cancer formation and adverse effects (Palyvoda et al., 2003). In their experimental studies with the ethanolic extract of the whole plant *Aristolochia krisagathra* Sivar. & Pradeep, Paulpiya et al. (2016), found anti-inflammatory activity of 87.1% at a dose of 400 mg/kg in rats. Among the compounds that could act in biological activity are alkaloids, anthraquinone, coumarin, flavonoids, phenol,

quinone, saponin, steroids, tannins, and terpenoids.

Therefore, studies to identify isolated compounds from different parts of the plant may be crucial to elucidate these antioxidant effects and ensure the safe consumption of the plant. Such information is unprecedented and allows for further research involving *Aristolochia ridicula*, aiming to investigate other potential pharmacological and therapeutic effects and the plant's effects at prolonged consumption doses.

5. Conclusion

The *A. ridicula* stem aqueous extract (EAAR) exhibited low toxicity in acute toxicity testing, with an LD50 greater than 2000mg/kg. It did not alter behavior or the physiological signs analyzed. This study did not show genotoxic potential in peripheral blood cells nor clastogenic and aneugenic activity in the bone marrow cells of rats. The extract is not a mutagenic agent, as confirmed by the micronucleus assay.

6. Apoio Financeiro

This research received financial support from the Foundation for Support of Development of Teaching, Science, and Technology of the State of Mato Grosso do Sul through the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES), linked to the Ministry of Education of Brazil, through the grant of a scholarship for the principal author.

7. Referências

- Alviano, W.S., Alviano, D.S., Diniz, C.G., Antonioli, A.R., Alviano, C.S., Farias, L.M., Carvalho, M.A.R., Souza, M.M.G., Bolognese, A.M., 2008. In vitro antioxidant potential of medicinal plant extracts and their activities against oral bacteria based on Brazilian folk medicine. *Archives of Oral Biology* 53, 545–552. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2007.12.001>
- Araldi, R.P., de Melo, T.C., Mendes, T.B., de Sá Júnior, P.L., Nozima, B.H.N., Ito, E.T., de Carvalho, R.F., de Souza, E.B., de Cassia Stocco, R., 2015. Using the comet and micronucleus assays for genotoxicity studies: A review. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 72, 74–82. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2015.04.004>
- Araújo, F.H.S. de, 2021. Avaliação da toxicidade aguda, potenciais genotóxicos, imunomodulatórios e investigação dos efeitos anti-hiperglicêmicos do infuso liofilizado das folhas de *Aristolochia triangularis* Cham.
- Castro, A.P. de, Mello, F.B. de, Mello, J.R.B. de, 2005. Avaliação toxicológica do Ginkgo biloba sobre a fertilidade e reprodução de ratos Wistar. *Acta Scientiae Veterinariae* 33, 265–269.

- Castro, M.R. de, Figueiredo, F.F., 2020. 240. Estudos e pesquisas sobre o uso de plantas medicinais e fitoterápicas no Brasil: caminhos e desafios. *Ar@cne. Revista Electrónica de Recursos en Internet sobre Geografía y Ciencias Sociales*. <https://doi.org/10.1344/ara2020.240.30986>
- Castro, R.A. de, Albiero, A.L.M., 2016. O mercado de matérias primas para indústria de fitoterápicos. The raw material market for phytotherapy industry.
- Chen, T., 2020. Genotoxicity of aristolochic acid: A review. *Journal of Food and Drug Analysis* 15. <https://doi.org/10.38212/2224-6614.2395>
- Dantas, F.G. da S., 2019. Teste de Ames para avaliação do potencial mutagênico de plantas medicinais e novas moléculas com atividades biológicas. Ames test for the evaluation of the mutagenic potential of medicinal plants and new molecules with biological activities.
- Düsman, E., Berti, A.P., Soares, L.C., Vicentini, V.E.P., 2012. PRINCIPAIS AGENTES MUTAGÊNICOS E CARCINOGENÉTICOS DE EXPOSIÇÃO HUMANA. *SaBios-Revista de Saúde e Biologia* 7.
- Fenech, M., 2000. The in vitro micronucleus technique. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 455, 81–95. [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(00\)00065-8](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(00)00065-8)
- Fernandes, F.H., Bustos-Obregon, E., Salvadori, D.M.F., 2015. Disperse Red 1 (textile dye) induces cytotoxic and genotoxic effects in mouse germ cells. *Reproductive Toxicology* 53, 75–81. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2015.04.002>
- Flores, M., Yamaguchi, M.U., 2008. Teste do Micronúcleo: Uma Triagem para Avaliação Genotóxica. *Saúde e Pesquisa* 1, 337–340.
- Fonseca, C.A., Pereira, D.G., 2013. Aplicação da genética toxicológica em planta com atividade medicinal. *Infarma-Ciências Farm* 16, 51–54.
- Frei, H., Würigler, F.E., Juon, H., Hall, C.B., Graf, U., 1985. Aristolochic acid is mutagenic and recombinogenic in *Drosophila* genotoxicity tests. *Arch Toxicol* 56, 158–166. <https://doi.org/10.1007/BF00333420>
- Han, J., Xian, Z., Zhang, Y., Liu, J., Liang, A., 2019. Systematic Overview of Aristolochic Acids: Nephrotoxicity, Carcinogenicity, and Underlying Mechanisms. *Frontiers in Pharmacology* 10.
- Heinrich, M., Chan, J., Wanke, S., Neinhuis, C., Simmonds, M.S.J., 2009. Local uses of *Aristolochia* species and content of nephrotoxic aristolochic acid 1 and 2—A global assessment based on bibliographic sources. *Journal of Ethnopharmacology* 125, 108–144. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2009.05.028>
- Hiremath, G.I., Ahn, Y.-J., Kim, S.-I., 1997. Insecticidal Activity of Indian Plant Extracts against *Nilaparvata lugens* (Homoptera: Delphacidae). *Applied Entomology and Zoology* 32, 159–166. <https://doi.org/10.1303/aez.32.159>
- Kang, Y.-C., Chen, M.-H., Lin, Chung-Ying, Lin, Chih-Yun, Chen, Y.-T., 2021. Aristolochic acid-associated urinary tract cancers: an updated meta-analysis of risk and oncologic outcomes

after surgery and systematic review of molecular alterations observed in human studies. *Therapeutic Advances in Drug Safety* 12, 2042098621997727. <https://doi.org/10.1177/2042098621997727>

Kar, D.R., Ghosh, P., Suresh, P., Chandra, S., Paul, D., 2022. Review on Phyto-chemistry & pharmacological activity of *Melia azedarach*. *International Journal of Experimental Research and Review* 28, 38–46. <https://doi.org/10.52756/ijerr.2022.v28.006>

León-Díaz, R., Meckes, M., Said-Fernández, S., Molina-Salinas, G.M., Vargas-Villarreal, J., Torres, J., Luna-Herrera, J., Jiménez-Arellanes, A., 2010. Antimycobacterial neolignans isolated from *Aristolochia taliscana*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 105, 45–51. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762010000100006>

Li, W., Chan, C.-K., Wong, Y.-L., Chan, K.K.J., Chan, H.W., Chan, W., 2018. Cooking methods employing natural anti-oxidant food additives effectively reduced concentration of nephrotoxic and carcinogenic aristolochic acids in contaminated food grains. *Food Chemistry* 264, 270–276. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.05.052>

Machado, M.B., Lopes, L.M.X., 2008. Tetraflavonoid and biflavonoids from *Aristolochia ridicula*. *Phytochemistry* 69, 3095–3102. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2008.04.025>

Maciel, M.A.M., Pinto, A.C., Veiga Jr., V.F., Grynberg, N.F., Echevarria, A., 2002. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. *Quím. Nova* 25, 429–438. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422002000300016>

Malone, M., Robichaud, R., 1962. A Hippocratic screen for pure or crude drug materials.

Mello, F.B. de, Mello, J.R.B. de, Maia, J.Z., Castro, A.P. de, 2004. Avaliação dos efeitos do *Pygeum africanum rosaceae* sobre a fertilidade de ratos. Evaluation of the effect of *Pygeum africanum rosaceae* in rat fertility.

Messiano, G.B., Vieira, L., Machado, M.B., Lopes, L.M.X., de Bortoli, S.A., Zukerman-Schpector, J., 2008. Evaluation of Insecticidal Activity of Diterpenes and Lignans from *Aristolochia malmeana* against *Anticarsia gemmatilis*. *J. Agric. Food Chem.* 56, 2655–2659. <https://doi.org/10.1021/jf703594z>

Møller, P., 2018. The comet assay: ready for 30 more years. *Mutagenesis* 33, 1–7. <https://doi.org/10.1093/mutage/gex046>

Mueller, L.P., Sarabia, D.T., Mueller, L.P., Cardoso, C.A.L., Batistote, M., 2019. O POTENCIAL ASSOCIADO DAS FONTES RENOVÁVEIS E SACCHAROMYCES CEREVISIAE PARA PRODUÇÃO DE BIOETANOL. *Educação Ambiental em Ação XVIII*.

Navickiene, H.M.D., Lopes, L.M.X., 2001. Alkamides and phenethyl derivatives from *Aristolochia gehrtii*. *J. Braz. Chem. Soc.* 12, 467–472. <https://doi.org/10.1590/S0103-50532001000400004>

OECD, 2022. Test No. 425: Acute Oral Toxicity: Up-and-Down Procedure. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.

OECD, 2016. Test No. 489: In Vivo Mammalian Alkaline Comet Assay. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.

OECD, 2014. Test No. 474: Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.

Oliveira, F.Q., Gonçalves, L.A., 2007. CONHECIMENTO SOBRE PLANTAS MEDICINAIS E FITOTERÁPICOS E POTENCIAL DE TOXICIDADE POR USUÁRIOS DE BELO HORIZONTE, MINAS GERAIS. Rev. Eletr. Farm. 3. <https://doi.org/10.5216/ref.v3i2.2074>

Palyvoda, O., Polańska, J., Wygoda, A., Rzeszowska-Wolny, J., 2003. DNA damage and repair in lymphocytes of normal individuals and cancer patients: studies by the comet assay and micronucleus tests. Acta Biochim Pol 50, 181–190. https://doi.org/10.18388/abp.2003_3725

Paulpriya, K., Tresina, P.S., Mohan, V.R., 2016. Investigation of anti-inflammatory activity of *Aristolochia krisagathra* Sivarajan and Pradeep. Int. J. Pharm 5, 132–135.

Ribeiro, L.R., Salvador, D.M.F., Marques, E.K., 2003. Teste do micronúcleo em medula óssea de roedores in vivo. Mutagênese Ambiental. ULBRA, Canoas 173–178.

Rodriguez, I.I.G., 2010. Avaliação da Atividade antiofídica de *Aristolochia sprucei*: Isolamento e caracterização estrutural de composto bioativo (PhD Thesis). Universidade de São Paulo.

Sales, I.M.S., Silva, J.M., Moura, E.S.R., Alves, F.D.S., Silva, F.C.C., Sousa, J.M.C., Peron, A.P., 2017. Toxicity of synthetic flavorings, nature identical and artificial, to hematopoietic tissue cells of rodents. Braz. J. Biol. 78, 306–310. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.07716>

Salomé, D. da C., Cordeiro, N. de M., Valério, T.S., Santos, D. de A., Alves, P.B., Alviano, C.S., Moreno, D.S.A., Fernandes, P.D., 2020. *Aristolochia trilobata*: Identification of the Anti-Inflammatory and Antinociceptive Effects. Biomedicines 8, 111. <https://doi.org/10.3390/biomedicines8050111>

Sarmiento Gadelha, C., Pinto Junior, V.M., Santos Bezerra, K.K., Maniçoba Pereira, B.B., Borges Maracajá, P., 2013. Estudo bibliográfico sobre o uso das plantas medicinais e fitoterápicos no Brasil. Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável 208–212.

Schmid, W., 1976. The Micronucleus Test for Cytogenetic Analysis, in: Hollaender, A. (Ed.), Chemical Mutagens: Principles and Methods for Their Detection, Chemical Mutagens. Springer US, Boston, MA, pp. 31–53. https://doi.org/10.1007/978-1-4684-0892-8_2

SiBBR, 2021. Species: *Aristolochia ridicula* (Jarrinha) [WWW Document]. URL <https://ala-bie.sibbr.gov.br/ala-bie/species/245430> (accessed 1.24.24).

Silva, E.J.R., Aguiar, F.J.S., Gonçalves, E.S., Sousa, I.M.V., Dimech, G.S., Fraga, M.C.C.A., Coelho, M.C.O.C., Wanderley, A.G., 2005. Avaliação do tratamento subcrônico com o extrato hidroalcoólico de *Calendula officinalis* L. sobre os parâmetros bioquímicos e hematológicos em ratos Wistar. Rev. bras. farmacogn. 15, 88–93. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2005000200003>

Słoczyńska, K., Powroźnik, B., Pękala, E., Waszkielewicz, A.M., 2014. Antimutagenic compounds and their possible mechanisms of action. J Appl Genetics 55, 273–285. <https://doi.org/10.1007/s13353-014-0198-9>.

Traesel, G.K., de Souza, J.C., de Barros, A.L., Souza, M.A., Schmitz, W.O., Muzzi, R.M., Oesterreich, S.A., Arena, A.C., 2014. Acute and subacute (28 days) oral toxicity assessment of the oil extracted from *Acrocomia aculeata* pulp in rats. *Food and Chemical Toxicology* 74, 320–325. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2014.10.026>

Veloso, M.S., 2019. Avaliação da toxicidade do extrato bruto Etanólico da *Aristolochia Cymbifera* Mart. & Zucc. em rato.

Wu, T., Damu, A.G., Su, C., Kuo, P., 2005. Chemical constituents and pharmacology of *Aristolochia* species. *Studies in natural products chemistry* 32, 855.

Zhang, G., Shimokawa, S., Mochizuki, M., Kumamoto, T., Nakanishi, W., Watanabe, T., Ishikawa, T., Matsumoto, K., Tashima, K., Horie, S., Higuchi, Y., Dominguez, O.P., 2008. Chemical Constituents of *Aristolochia constricta* : Antispasmodic Effects of Its Constituents in Guinea-Pig Ileum and Isolation of a Diterpeno–Lignan Hybrid. *J. Nat. Prod.* 71, 1167–1172. <https://doi.org/10.1021/np800041t>

Zhou, Q., Pei, J., Poon, J., Lau, A.Y., Zhang, L., Wang, Y., Liu, C., Huang, L., 2019. Worldwide research trends on aristolochic acids (1957–2017): Suggestions for researchers. *PLOS ONE* 14, e0216135. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0216135>

TABLES

Table 1. Food intake (g/day), water consumption (mL/day) and Body weight (g) of male and female Wistar rats in acute toxicity, orally treated with EAAR (2000 mg/kg) and negative control group.

Male		
	Negative control	EAAR
Food intake (g/day)	31.0 ± 0.64	29.8 ± 0.64
Water consumption (mL/day)	56.3 ± 2.10	57.1 ± 2.10
Initial Body weight (g)	269.6 ± 4.06	274 ± 2.93
Final Body weight (g)	311.6 ± 4.58	317.8 ± 2.41
Weight Gain (g)	41.6 ± 2.15	43.6 ± 3.65
Female		
	Negative control	EAAR
Food intake (g/day)	27.5 ± 0.64	25.5 ± 0.64
Water consumption (mL/day)	50.4 ± 2.10	51.6 ± 2.10
Initial Body weight (g)	175.6 ± 3.70	193.2 ± 2.00
Final Body weight (g)	212.4 ± 4.75	225.4 ± 3.23
Weight Gain (%)	36.8 ± 1.98	32.2 ± 1.59

Values are expressed as mean ± SEM (standard error of the mean). n = 5. Statistical analyses were performed using one-way ANOVA, followed by t test. * Significant statistical differences (p < 0.05).

Table 2. Organs weight (g) of male and female Wistar rats in acute toxicity, orally treated with EAAR (2000 mg/kg) and negative control.

Male		
	Negative control	EAAR
Spleen	0.64 ± 0.01	0.59 ± 0.01
Liver	12.21 ± 0.28	13.03 ± 0.28
Heart	0.95 ± 0.02	0.97 ± 0.02
Kidney	1.18 ± 0.04	1.18 ± 0.0497
Testicles	1.53 ± 0.03	1.38 ± 0.03*
Epididymis	0.47 ± 0.01	0.45 ± 0.01
Female		
	Negative control	EAAR
Spleen	0.47 ± 0.01	0.47 ± 0.01
Liver	8.85 ± 0.28	9.89 ± 0.28
Heart	0.69 ± 0.01	0.79 ± 0.01
Kidney	0.78 ± 0.04	0.79 ± 0.04
Uterus	0.48 ± 0.01	0.47 ± 0.01
Ovaries	0.08 ± 0.00	0.08 ± 0.00

Values are expressed as mean ± SEM (standard error of the mean). n = 5. Statistical analyses were performed using one-way ANOVA followed by t test. * Significant statistical differences (p < 0.05).

Table 3. Mean frequency of micronucleated polychromatic erythrocytes (no) and the ratio between polychromatic erythrocytes and normochromatic erythrocytes – PCE/NCE

Experimental groups	Micronucleus		PCE/NCE	
	Female	Male	Female	Male
Negative control	9.9 ± 1.07	10.4 ± 0.64	1.01 ± 0.08	1.02 ± 0.05
Positive control	0.5 ± 0.27	0.7 ± 0.25	0.52 ± 0.68	0.53 ± 0.03
EAAR (2000 mg/kg)	1.1 ± 0.29	1.0 ± 0.41	1.26 ± 0.12 ^b	1.17 ± 0.04 ^b

Values are expressed as mean ± SEM (standard error of the mean). n = 5. Statistical analyses were performed using one-way ANOVA, followed by pos-test Tukey. a Significant statistical differences when compared with negative group (p < 0.05). b Significant statistical differences when compared with positive group (p < 0.05).

Table 4. Frequency of damage by the comet assay in rats treated orally with EAES

Groups	Damage levels					DDI
	0	1	2	3	4	
Female						
Negative control	33.6 ± 1.80	50.2 ± 1.80	9.2 ± 2.35	5.2 ± 0.96	1.6 ± 0.67	0.91 ± 0.07
Positive control	11 ± 1.37	13.2 ± 1.31	19.8 ± 2.13	28.2 ± 1.68	27.8 ± 3.08	2.49 ± 0.07
EAAR (2000 mg/kg)	36.2 ± 3.45 ^b	29.2 ± 1.77 ^{ab}	23.2 ± 2.69 ^a	9.6 ± 3.32 ^b	5.4 ± 1.02 ^b	1.26 ± 0.11 ^{ab}
Male						
Negative control	40.8 ± 5.17	44.4 ± 2.63	9.0 ± 2.40	4.4 ± 0.50	1.4 ± 1.16	0.81 ± 0.09
Positive control	10 ± 1.14	15.8 ± 1.52	20.8 ± 2.98	31 ± 1.00	22.4 ± 1.56	2.40 ± 0.04
EAAR (2000 mg/kg)	35.6 ± 3.29 ^b	30.6 ± 1.53 ^{ab}	22.6 ± 1.96 ^a	7.2 ± 1.35 ^b	4 ± 0.70 ^b	1.13 ± 0.07 ^{ab}

Values are expressed as mean ± SEM (standard error of the mean). n = 5. Statistical analyses were performed using one-way ANOVA, followed by pos-test Tukey.

^aSignificant statistical differences when compared with negative group (p < 0.05). ^bSignificant statistical differences when compared with positive group (p < 0.05). Class 0 – indicates the lowest level of degradation; class 1 – low level of damage; class 2 – medium level damage; class 3 –high level of damage; class 4- total damage. DDI: (damage class times damage nu

6. ANEXOS

6.1 Parecer de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA

Dourados-MS, 13 de fevereiro de 2023.

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada **"Avaliação da toxicidade aguda, subaguda e toxicogenética do extrato aquoso liofilizado dos caules de *Aristolochia ridicula*."**, registrada sob o protocolo de nº 15.2021, sob a responsabilidade de **SILVIA APARECIDA OESTERICH** – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFGD) da Universidade Federal Da Grande Dourados, em reunião de 30/11/2021.

<i>Finalidade</i>	() Ensino (X) Pesquisa Científica
<i>Vigência do projeto de pesquisa</i>	05/01/2022 a 16/02/2024
<i>Espécie/linhagem/raça</i>	Rato heterogênico Wistar
<i>Nº de animais</i>	70 animais - 30 machos e 40 fêmeas
<i>Peso/idade</i>	250-300g
<i>Sexo</i>	30 machos e 40 fêmeas
<i>Procedência</i>	Biotério Central UFGD

Daniela Torres Cantadori
Coordenadora em exercício CEUA/UFGD

6.2 Cadastro da planta no Sistema Nacional de Gestão do patrimônio genético e do conhecimento tradicional associado (SISGEN)


Claudio Rodrigo Nogueira <claudiornogueira@ufgd.edu.br>

Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado
1 mensagem

SisGen <sisgen@mma.gov.br>
Para: claudiornogueira@ufgd.edu.br

24 de janeiro de 2024 às 10:10

SisGen

Senhor(a),

informamos que foi realizado cadastro de acesso abaixo identificado no SisGen.

Número do Cadastro: **AE2A578**
 Usuário: **CLAUDIO RODRIGO NOGUEIRA**
 CPF/CNPJ: **08076016673**
 Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético e Conhecimento Tradicional Associado**
 Data: **24/01/2024**

Para visualizar o cadastro completo, acesse o [SisGen](#).

SisGen
Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado

6.3 Comprovante de Submissão Artigo I

[Fronteiras] Agradecimento pela submissão - DO CONHECIMENTO POPULAR À CIÊNCIA: UM PANORAMA DOS ESTUDOS SOBRE O GÊNERO Aristolochia (2013-2023) Caixa de entrada x

🔍 📧



Dr. Irsné Oliveira Silva <aee.dspace@gmail.com>
para mim ▾

13:32 (há 52 minutos) ☆ ☺ ↶ ⋮

laís chancare garcia,

Agradecemos a submissão do trabalho "DO CONHECIMENTO POPULAR À CIÊNCIA: UM PANORAMA DOS ESTUDOS SOBRE O GÊNERO Aristolochia (2013-2023)" para a revista Fronteiras: Journal of Social, Technological and Environmental Science.

Acompanhe o progresso da sua submissão por meio da interface de administração do sistema, disponível em:

URL da submissão: <http://periodicos.unievangelica.edu.br/index.php/fronteiras/authorDashboard/submission/7319>
 Login: 04237904121

Em caso de dúvidas, entre em contato via e-mail.

Agradecemos mais uma vez considerar nossa revista como meio de compartilhar seu trabalho.

—
 Irsné Oliveira Silva (Editor Chefe)
 Sandro Dutra e Silva (Editor)

Revista Fronteiras: Journal of Social, Technological and Environmental Science
fronteiras.journal@unievangelica.edu.br - <http://periodicos.unievangelica.edu.br/fronteiras/>



FRONTEIRAS

Journal of Social, Technological and Environmental Science

2238-8869