

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS  
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**Avaliação da Toxicidade Reprodutiva Pré-clínica do Extrato Etanólico dos Frutos da  
Guavira (*Campomanesia pubescens*)**

**JACENIR VIEIRA DA SILVA**

**Dourados – MS  
2024**

JACENIR VIEIRA DA SILVA

Avaliação da Toxicidade Reprodutiva Pré-clínica do Extrato Etanólico dos  
Frutos da Guavira (*Campomanesia pubescens*)

Área do CNPq: 4.01.01.10-0

Tese 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 Doutor em Ciências da Saúde

Área de concentração: Farmacologia

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Silvia Aparecida Oesterreich

DOURADOS – MS

2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

S586a Silva, Jacenir Vieira Da  
Avaliação da Toxicidade Reprodutiva Pré-clínica do Extrato Etanólico dos Frutos da Guavira  
(Campomanesia pubescens) [recurso eletrônico] / Jacenir Vieira Da Silva. -- 2024.  
Arquivo em formato pdf.

Orientadora: Sílvia Aparecida Oesterreich.  
Tese (Doutorado 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. Fitoterápicos. 2. Plantas brasileiras. 3. Myrtaceae. 4. Toxicidade. 5. Micronúcleo. I.  
Oesterreich, Sílvia 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 TESE DE DOUTORADO APRESENTADA POR JACENIR VIEIRA DA SILVA, ALUNO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO "FARMACOLOGIA".

Aos quatro dias do mês de março 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 Tese de Doutorado intitulada **"Avaliação da Toxicidade Reprodutiva Pré-clínica do Extrato Etanólico dos Frutos da Guavira (*Campomanesia pubescens*)."**, apresentada pelo doutorando Jacenir Vieira da Silva, do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, à Banca Examinadora constituída pelos membros: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Silvia Aparecida Oesterreich/UFGD (presidente/orientadora), Prof. Dr. Pablo Christiano Barboza Lollo/UFGD (membro titular interno), Prof. Dr. Gustavo Roberto Villas Boas/UFOB (membro titular externo), Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Mariana Bento Tatará/UFGD (membro titular externo), Prof. Dr. Rhanany Alan Calloi Palozi/UNIGRAN (membro titular externo). Iniciados os trabalhos, a presidência deu a conhecer ao candidato e aos integrantes da banca as normas a serem observadas na apresentação da Tese. Após o candidato ter apresentado a sua Tese, os componentes da Banca Examinadora fizeram suas arguições. Terminada a Defesa, a Banca Examinadora, em sessão secreta, passou aos trabalhos de julgamento, tendo sido o candidato considerado APROVADO. 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, 04 de março de 2024.

Documento assinado digitalmente  
**SILVIA APARECIDA OESTERREICH**  
Data: 04/03/2024 17:10:15-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Silvia Aparecida Oesterreich  
Presidente/orientadora  
(Participação Remota)

Documento assinado digitalmente  
**PABLO CHRISTIANO BARBOZA LOLLO**  
Data: 06/03/2024 14:30:43-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

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

Documento assinado digitalmente  
**Gustavo Roberto Villas Boas**  
Data: 05/03/2024 14:39:28-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

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

Documento assinado digitalmente  
**MARIANA BENTO TATARA**  
Data: 05/03/2024 13:58:01-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Mariana Bento Tatará  
Membro Titular Externo  
(Participação Remota)

Documento assinado digitalmente  
**RHANANY ALAN CALLOI PALOZI**  
Data: 07/03/2024 16:25:19-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Rhanany Alan Calloi Palozi  
Membro Titular Externo  
(Participação Remota)

(PARA USO EXCLUSIVO DA PROPP)

ATA HOMOLOGADA EM: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_, PELA PROPP/ UFGD.

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha mãe Domingas Rosa da Silva, *in memoriam* de meus avós Ananias Rosa e Maria das Dores Rosa, à minha esposa Anahy Arruda Burigato e aos meus filhos Marco Túlio Burigato Vieira e em especial ao Otávio Augusto Burigato Vieira, que faz de minha vida um enorme aprendizado e superação.

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente ao Altíssimo criador do Universo pelo dom da vida e permissão para que pudesse concretizar um verdadeiro sonho e ideal de vida. À minha mãe que foi uma guerreira, meu pai e minha mãe, sempre fez de tudo para que eu estudasse e compartilhasse tudo que aprendi com meus semelhantes, elevando a importância dos estudos em nossa vida para o aprimoramento moral e intelectual.

À minha esposa e filhos pela paciência e compreensão durante esta jornada complexa e trabalhosa.

À minha primeira professora que lhe permitia chamar de “Tia Marilda”. Ao Dr. Pablo Christiano Barboza Lollo pelo início do doutorado e, em especial, a minha orientadora neste momento tão importante de minha vida Dr<sup>a</sup> Silvia Aparecida Oesterreich, pelo auxílio, apoio, ensinamentos durante o doutorado. Sem esses jamais conseguiria chegar a conclusão deste trabalho, sempre prestativa, gentil e educada com os colegas de trabalho, técnicos e, sobretudo, com seus alunos.

Aos colegas da FCS- Faculdade de Ciências da Saúde que sempre se dispuseram a ajudar com tudo que estava ao seu alcance, com suas palavras de apoio, energia positiva e contribuição científica e intelectual, compartilhando suas experiências e conhecimentos.

Por fim, a equipe do Letox- Laboratório de Toxicologia coordenado pela Dr<sup>a</sup> Silvia Aparecida Oesterreich, que em todas as atividades estiveram em parceria e auxílio na construção execução e conclusão desta pesquisa.

## **EPÍGRAFE**

A diferença entre o remédio e o veneno é a dose.

Paracelso, século XVI.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

|                                                                                                                                     |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Imagem 1.</b> <i>Campomanesia pubescens</i> frutos (A), flores (B) e planta (C e D). .....                                       | 19 |
| <b>Imagem 2.</b> Folhas e frutos de <i>Campomanesia pubescens</i> .....                                                             | 20 |
| <b>Imagem 3.</b> Extrato-etanólico- <i>Campomanesia pubescens</i> .....                                                             | 88 |
| <b>Imagem 4.</b> Presença de espermatozóides em lavado vaginal durante processo de acasalamento pelo método de Poley. ....          | 89 |
| <b>Imagem 5.</b> Ciclo estral Diestro detectado em lavado vaginal durante processo de acasalamento.....                             | 89 |
| <b>Imagem 6.</b> Ciclo estral Metaestro detectado em lavado vaginal durante processo de acasalamento....                            | 89 |
| <b>Imagem 7.</b> Ciclo estral Estro detectado em lavado vaginal durante processo de acasalamento.....                               | 90 |
| <b>Imagem 8.</b> Ciclo estral Proestro detectado em lavado vaginal durante processo de acasalamento.....                            | 90 |
| <b>Imagem 9.</b> Laparotomia exploratória-cesariana grupo tratamento dose 125 mg/KG Extrato etanólico de <i>C. pubescens</i> . .... | 91 |
| <b>Imagem 10.</b> Feto e placenta grupo tratamento dose 125 mg/KG Extrato etanólico de <i>C. pubescens</i> . .                      | 91 |
| <b>Imagem 11-</b> Fetos e placentas placenta grupo tratamento dose 250 mg/KG Extrato etanólico de <i>C. pubescens</i> . ....        | 92 |
| <b>Imagem 12.</b> Implantações uterinas grupo tratamento dose 250 mg/KG Extrato etanólico de <i>C. pubescens</i> . ....             | 92 |
| <b>Imagem 13 .</b> Feto após diafanização com vermelho de alizarina, para análise esquelética.....                                  | 93 |
| <br><b>Figura 1.</b> Estrutura básica e exemplo das três classes de metabólitos vegetais secundários. ....                          | 22 |



## **LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS**

ADME - Administração, Distribuição, Metabolismo e Excreção.

ANVISA- Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

CN - controle negativo.

CP- controle positivo.

EEFCP - extrato etanólico dos frutos da *Campomanesia pubescens*.

FDA- Food and Drug Administration.

ERO- espécies reativas ao oxigênio.

ERN- espécie reativas ao nitrogênio.

OECD - Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico.

SINTOX- Sistema Nacional de informações Tóxico-farmacológicas.

GPX- glutathione peroxidase.

SOD - superóxido dismutase.

## **Avaliação da Toxicidade Reprodutiva Pré-clínica do Extrato Etanólico dos Frutos da Guavira (*Campomanesia pubescens*).**

### **RESUMO**

*Campomanesia pubescens* (O. Berg) Mattos é uma espécie vegetal nativa brasileira amplamente utilizada na alimentação e na medicina popular. A influência da *Campomanesia pubescens* no desenvolvimento embrionário ainda não é conhecida. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a segurança do consumo do extrato etanólico dos frutos de *Campomanesia pubescens* em modelo de toxicidade reprodutiva. Foi realizada uma revisão sistemática dos estudos com *Campomanesia pubescens* com o objetivo de sintetizar as evidências disponíveis na literatura sobre a caracterização bioquímica e potenciais efeitos biológicos, em conformidade com o protocolo PRISMA. Foram consultadas as seguintes bases de dados: PubMed, Web of Sciences, CENTRAL e Scopus, com estudos publicados até 5 de dezembro de 2023. Devido à importância dos ensaios de toxicidade para a segurança no uso da planta para consumo humano, foi implementado estudo experimental com o objetivo de avaliar o efeito do extrato etanólico dos frutos da planta na toxicidade reprodutiva em modelo animal. O extrato foi obtido a partir dos frutos descascados. Este experimento foi conduzido conforme segmento II do protocolo de toxicidade reprodutiva. Foram utilizados 88 ratos Wistar fêmeas. Os animais foram randomizados nos seguintes grupos: controle negativo salino (CN), controle positivo (controle ciclofosfamida – CP), 125 mg/kg (CP125), 250 mg/kg (CP250), 500 mg/kg (CP500), 1000 mg/kg (CP500). mg/kg (CP1000). O extrato apresentou efeito antioxidante significativo nos ensaios DPPH, ABTS e FRAP. Não houve diferenças estatísticas significativas em nenhum dos parâmetros analisados. Desta forma, conclui-se que o extrato etanólico dos frutos de *Campomanesia pubescens* apresenta baixo nível de toxicidade na fase reprodutiva e, nas doses testadas, não causou efeitos mutagênicos.

**Palavras-chave:** Fitoterápicos. Plantas brasileiras. Myrtaceae. Toxicidade. Micronúcleo.

## Assessment of Preclinical Reproductive Toxicity of Ethanolic Extract of Guavira Fruits (*Campomanesia pubescens*).

### ABSTRACT

*Campomanesia pubescens* (O. Berg) Mattos is a native Brazilian plant species widely used in food and folk medicine. The influence of *Campomanesia pubescens* on embryonic development is not yet known. Thus, this study aimed to evaluate the safety of consuming the ethanolic extract of *Campomanesia pubescens* fruits in a reproductive toxicity model. A systematic review of studies with *Campomanesia pubescens* was carried out to synthesize the evidence available in the literature on biochemical characterization and potential biological following the PRISMA protocol. The following databases were consulted: PubMed, Web of Sciences, CENTRAL, and Scopus, with studies published until december, 2023. Extracts from different parts of *Campomanesia pubescens* have a high content of functional compositions with antioxidant, antimicrobial, and anti-inflammatory action without evidence toxicity and/or genotoxicity. Due to the importance of toxicity tests for the consumption of the plant, an experimental study was implemented to evaluate the effect of the ethanolic extract of the plant's fruits on reproductive toxicity in an animal model. The extract was obtained from peeled fruits. This experiment was conducted by segment II of the reproductive toxicity protocol. 88 female Wistar rats were used. The animals were classified into the following groups: saline negative control (CN), positive control (cyclophosphamide control – CP), groups treated with EEFCP- ethanoic extract of *Campomanesia pubescens* fruits at doses 125 mg/kg (CP125), 250 mg/kg (CP250), 500 mg/kg (CP500), 1000 mg /kg (CP500). mg/kg (CP1000). It showed a significant antioxidant effect in the DPPH, ABTS and FRAP assays. There were no statistical differences in any of the analyzed parameters. Therefore, it is concluded that the ethanolic extract of *Campomanesia pubescens* fruits has a low level of toxicity in the reproductive phase and, at the doses tested, does not contain mutagenic effects.

**Keywords:** Phytotherapics. Brazilian plants. Myrtaceae. Toxicity. Micronucleus.

## SUMÁRIO

|       |                                                                                                                                                      |    |
|-------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1     | INTRODUÇÃO .....                                                                                                                                     | 13 |
| 2     | REVISÃO DE LITERATURA .....                                                                                                                          | 15 |
| 2.1   | <i>Espécies vegetais como recurso medicinal</i> .....                                                                                                | 15 |
| 2.2   | <i>A família Myrtaceae</i> .....                                                                                                                     | 15 |
| 2.5   | <i>Características fito-químicas do gênero Campomanesia</i> .....                                                                                    | 20 |
| 2.6   | <i>Estudos farmacológicos com Campomanesia Pubescens</i> .....                                                                                       | 24 |
| 2.7   | <i>Estresse oxidativo e período gestacional: radicais livres e antioxidantes</i> .....                                                               | 25 |
| 2.8   | <i>Ensaio de toxicidade</i> .....                                                                                                                    | 26 |
| 2.8.1 | <i>Desenho experimental da toxicidade</i> .....                                                                                                      | 28 |
| 2.8.2 | <i>Desenho experimental da mutação gênica</i> .....                                                                                                  | 29 |
| 2.9   | <i>Toxicologia reprodutiva</i> .....                                                                                                                 | 30 |
| 2.10  | <i>Plantas Medicinais e Toxicidade reprodutiva</i> .....                                                                                             | 32 |
| 3     | OBJETIVOS .....                                                                                                                                      | 34 |
| 3.1   | <i>Objetivo Geral</i> .....                                                                                                                          | 34 |
| 3.2   | <i>Objetivos específicos</i> .....                                                                                                                   | 34 |
| 4     | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....                                                                                                                     | 35 |
| 5     | APÊNDICES .....                                                                                                                                      | 45 |
|       | <i>Artigo 1: Biochemical characterization and potential biological functions of extracts from Campomanesia Pubescens – A systematic review</i> ..... | 46 |
|       | <i>Artigo 2: Assessment of Preclinical Reproductive Toxicity of Ethanolic Extract of Campomanesia pubescens (O.Berg) Mattos Fruits</i> .....         | 64 |
| 6     | CONCLUSÕES .....                                                                                                                                     | 87 |
| 7     | MATERIAL COMPLEMENTAR .....                                                                                                                          | 88 |
| 8     | PARTICIPAÇÃO EM TRABALHOS DO GRUPO DE PESQUISA: .....                                                                                                | 94 |
| 9     | CARTA DE APROVAÇÃO CEUA - COMISSÃO ÉTICA NO USO DE ANIMAIS. ....                                                                                     | 95 |
| 10    | DOCUMENTOS ADICIONAIS DE CO-AUTORIA. ....                                                                                                            | 96 |

## 1 INTRODUÇÃO

O uso de produtos de origem vegetal, seja como alimento com benefícios para a saúde ou como recursos medicinais, está expandindo em escala global (OLIVEIRA *et al.*, 2011).

Na última década, especialmente, houve um substancial aumento na aceitação popular de abordagens terapêuticas naturais (BRAGA; SILVA, 2021).

O interesse por plantas medicinais pode ser atribuído a diversos fatores, notadamente: a eficácia comprovada dos tratamentos à base de plantas, a preferência crescente dos consumidores por terapias naturais, a crença equivocada de que produtos naturais raramente causam efeitos adversos, a insatisfação diante dos potenciais efeitos colaterais dos medicamentos convencionais e o custo elevado associado aos medicamentos modernos (EKOR, 2014; SILVA *et al.*, 2017).

À medida que a demanda mundial por produtos a base de plantas medicinais cresce, surgem inquietações relacionadas à segurança do consumo dos mesmos. Diversas plantas que fazem parte da dieta humana, apesar de apresentarem um potencial biológico promissor, carecem de avaliações abrangentes para identificar quaisquer efeitos adversos ou toxicidades potenciais (GORRIL *et al.*, 2016; AWUCHI, 2019).

O Cerrado brasileiro é considerado de grande riqueza para plantas medicinais. Muitas espécies vegetais nativas são utilizadas pela população local para alimentação, prevenção e tratamento de diversas doenças. *Campomanesia pubescens* (DC) O. Berg. (família Myrtaceae), popularmente conhecida como *guavira*, é uma espécie comum de planta do cerrado, com propriedades nutricionais e farmacológicas, muito utilizada na alimentação e na medicina popular (CARDOZO *et al.*, 2018).

Apesar de séculos de uso tradicional de plantas medicinais por diversas populações sugerirem segurança no seu uso, ao contrário dos medicamentos regulamentados, a toxicidade dos medicamentos fitoterápicos não foi totalmente avaliada na maioria dos casos. Portanto, estas plantas podem ser extremamente prejudiciais à saúde humana. Por exemplo, alguns estudos revelaram que plantas frequentemente utilizadas na medicina popular são potencialmente genotóxicas (ANANTHI *et al.*, 2010; MELO-REIS *et al.*, 2011).

A maioria dos compostos medicinais usados tradicionalmente pela população apresentam toxicidade aguda baixa onde seus dados de segurança disponíveis na literatura sugerirem baixo efeito tóxico em modelos animais e clínicos. No entanto, a influência da *Campomanesia pubescens* no feto ou no desenvolvimento embrionário ainda é desconhecida (GORRIL *et al.*, 2016; KHAN *et al.*, 2021).

Estudos prévios com o extrato etanólico dos frutos da *Campomanesia pubescens* (VILLAS BOAS *et al.*, 2018a, 2018b) demonstraram que, no teste de toxicidade a curto prazo, as doses testadas não produziram alterações significativas nos parâmetros comportamentais, fisiológicos, hematológicos ou histopatológicos em ratos. Portanto, que o extrato etanólico dos frutos da *Campomanesia pubescens* (EEFCP) apresenta baixa toxicidade aguda e a curto prazo e que o mesmo não é genotóxico para as células

de sangue periférico e não possui ação clastogênica/aneugênica em células de medula óssea dos animais. Além disso, os metabólitos de biotransformação do EEFCP não apresentaram atividade genotóxica, nos descendentes do cruzamento de bioativação, como demonstrado pelo teste SMART. Entretanto, não há estudos desse extrato sobre a toxicidade reprodutiva no período da organogênese em modelos animais (ratos). Desta forma, este estudo teve como objetivo avaliar atoxicidade do extrato da *Campomanesia pubescens* em modelo experimental de toxicidade reprodutiva no período pré-natal, visando testar a segurança do uso do mesmo para consumo humano, conforme recomendado pelas agências regulatórias (ANVISA, 2013; OECD, 2018).

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Espécies vegetais como recurso medicinal

Há milhares de anos, o ser humano tem explorado os recursos naturais como uma fonte de tratamento para diversas doenças. O conhecimento das propriedades terapêuticas das plantas, desde a antiguidade, foi descoberto e transmitido de geração em geração por meio da observação e experimentação (TUROLLA; NASCIMENTO, 2006; ROCHA *et al.*, 2021). Consequentemente, o uso de plantas com fins medicinais se consolidou na cultura popular ao longo do tempo (EKOR, 2014; SILVA *et al.*, 2017).

O Brasil se destaca como o país global com a maior diversidade de plantas, abrigando milhares de espécies vegetais com potencial para desenvolvimento fitoterápico e farmacológico (RIBEIRO *et al.*, 2011; CARDOZO *et al.*, 2018; FERNANDES *et al.*, 2020; CARVALHO; CONTE-JUNIOR, 2021; ROCHA *et al.*, 2021).

O Cerrado brasileiro é uma área prioritária para conservação da biodiversidade e é considerado a savana mais rica em diversidade biológica no mundo (DUTRA; SOUZA, 2017). Este bioma cobre cerca de 22,65% do território brasileiro, sendo predominante na região Centro-Oeste (MYERS *et al.*, 2000; DUTRA; SOUZA, 2017; FERNANDES *et al.*, 2020).

Diversas plantas do Cerrado são utilizadas pela população em sua alimentação, na fabricação de produtos artesanais, na produção de bebidas, na recuperação de solos degradados e na proteção contra os efeitos da erosão. Além disso, muitas dessas plantas são empregadas com finalidades terapêuticas sendo amplamente exploradas pelo uso etnofarmacológico (OLIVEIRA *et al.*, 2011; CARDOZO *et al.*, 2018; RIBEIRO NETO *et al.*, 2020; BARBOSA *et al.*, 2023).

O Cerrado desempenha um papel fundamental no fornecimento de espécies frutíferas de alto valor nutricional. Muitos frutos que se originam nesse bioma apresentam propriedades funcionais associadas à presença de diversos compostos (MOREIRA-ARAÚJO *et al.*, 2019).

### 2.2 A família Myrtaceae

A família Myrtaceae é uma das famílias botânicas mais abundantes na rica flora brasileira, composta por 142 gêneros e 5.800 espécies, distribuídas nas zonas tropicais e subtropicais do Hemisfério Sul (WILSON, 2011). Nas Américas, é particularmente notável devido à presença proeminente de árvores frutíferas que produzem frutos apreciados por seu valor nutricional e sabor, impactando significativamente tanto do ponto de vista ecológico quanto econômico

(CRUZ; KAPLAN, 2012; PEREIRA *et al.*, 2012; DE PAULO FARIAS *et al.*, 2020).

Esses frutos são consumidos *in natura* como na fabricação de doces, sorvetes, refrescos e licores, além de serem frequentemente usados como flavorizantes em bebidas alcoólicas destiladas. A indústria de produtos lácteos e sucos têm explorado cada vez mais esses frutos para a produção de polpas congeladas, suscitando o interesse tanto de produtores quanto de consumidores (DUARTE *et al.*, 2009, 2020).

As características distintivas das espécies pertencentes a essa família incluem folhas que geralmente são simples e apresentam glândulas oleíferas, flores que se destacam por sua disposição polistêmona (com numerosos estames), ovário que pode variar de mediano a ínfero (ou seja, abaixo do nível da inserção dos outros órgãos florais), a presença de floema interno e, ornamentos específicos na forma de pontuações que se alinham nos vasos do xilema, que é o tecido responsável pelo transporte de água e nutrientes nas plantas (AL-EDANY; AL-SAADI, 2012; DE PAULO FARIAS *et al.*, 2020).

A vasta família Myrtaceae é representada em todo o Cerrado brasileiro, um dos ecossistemas mais importantes e, ao mesmo tempo, ameaçados do país. As extensas áreas de Cerrado têm enfrentado uma considerável redução devido à exploração desenfreada imposta pelo ser humano (RANGEL *et al.*, 2007; DEL-CLARO; TOREZAN-SILINGARDI, 2019; FERREIRA *et al.*, 2020; MARQUES; FAZITO; CUNHA, 2022).

Contudo, a conscientização da importância dessas regiões na conservação da biodiversidade, tanto vegetal quanto animal, tem levado a um esforço significativo na preservação dessas áreas críticas (FERREIRA *et al.*, 2020).

Para promover o crescimento econômico e a segurança no consumo desses frutos, informações detalhadas sobre suas características químicas, valor nutricional e propriedades terapêuticas necessárias. O conhecimento sobre sua biologia, perfil fitoquímico, atividade biológica, eficácia farmacológica e perfil toxicológico ainda é escasso, o que destaca a urgência de esforços na conservação e pesquisa dessas espécies (GRESSLER; PIZO; MORELLATO, 2006).

Esses dados são essenciais para a formulação de novos produtos, além de contribuir para o avanço das pesquisas e o incentivo a um consumo mais informado e seguro desses frutos (CHANG *et al.*, 2011).

A rica diversidade de Myrtaceae encontradas no Brasil abriga diversas espécies de importância medicinal, que demonstram uma ampla gama de atividades biológicas. Algumas espécies como a *Campomanesia pubescens*, *Campomanesia xanthocarpa*, *Campomanesia adamantium* e *Psidium cattleianum*, exibem propriedades antioxidantes notáveis. Estudos



científicos têm apontado seus potenciais benefícios na neutralização de radicais livres, contribuindo para a proteção das células e tecidos (CARDOSO *et al.*, 2008; COUTINHO *et al.*, 2008; MARIN *et al.*, 2008; CHANG *et al.*, 2011; HALDER *et al.*, 2011).

*Campomanesia pubescens*, *Eugenia jambolana* e *Syzygium aromaticum* demonstram propriedades antimicrobianas. Essas plantas têm sido investigadas por sua capacidade de inibir o crescimento de microrganismos patogênicos, sugerindo aplicações no combate a infecções (JASMINE *et al.*, 2010; MACHADO *et al.*, 2010; CHANG *et al.*, 2011).

Outras mirtáceas, como *Campomanesia xanthocarpa* e *Eugenia jambolana*, exibem propriedades hipoglicemiantes. Essas plantas têm sido estudadas devido ao potencial de redução dos níveis glicêmicos o que pode ser benéfico para pessoas com diabetes ou em risco de desenvolver a doença e seus agravos secundários (BIAVATTI *et al.*, 2004; KUMAR *et al.*, 2010; SIDHU; SHARMA, 2013).

*Campomanesia xanthocarpa* e *Campomanesia adamantium*, demonstraram propriedades anti-inflamatórias e antinociceptivas. Isso sugere que essas plantas podem ajudar a reduzir a inflamação e aliviar a dor (FERREIRA *et al.*, 2013; DA SILVA *et al.*, 2016).

*Campomanesia pubescens* e *Syzygium aromaticum* exibem efeitos imunomodulatórios, o que significa que podem influenciar o sistema imunológico do organismo (CARRASCO *et al.*, 2010; GUERRERO *et al.*, 2010). A espécie *Eugenia jambolana*, por sua vez, é conhecida por suas propriedades hepatoprotetoras (SISODIA; BHATNAGAR, 2009).

### **2.3 Gênero *Campomanesia***

O gênero *Campomanesia* abriga aproximadamente 80 espécies, das quais 11 se destacam por sua frutificação (MADALOSSO, 2011). Apresentando uma ampla distribuição geográfica, com 25 espécies estendendo-se desde o México até a Argentina e 15 delas sendo nativas do Brasil. No território brasileiro é predominante nas regiões Centro-Oeste e Sul do país (MADALOSSO, 2011; CARDOZO *et al.*, 2018).

Uma característica dessas plantas é sua capacidade de adaptação a diferentes tipos de solos (JUNGLOS *et al.*, 2016). Algumas espécies, como a *Campomanesia adamantium*, demonstram boa adaptação em solos pobres em nutrientes e climas adversos (DRESCH *et al.*, 2016).

Os frutos que essas árvores e arbustos produzem florescem e amadurecem entre os meses de agosto e dezembro e desempenham papel fundamental no ecossistema, para a manutenção da biodiversidade e do equilíbrio ecológico (RIBAS-SANTOS; SANTOS; GUERRA, 2019). Eles

são uma fonte crucial de alimento para inúmeras formas de vida na fauna. Uma grande variedade de pássaros, pequenos mamíferos, peixes e répteis apreciam essas frutas e desempenham um papel essencial na disseminação das sementes dessas espécies. As *Campomanesias* florescem e amadurecem seus frutos entre os meses de agosto e dezembro (VALLILO *et al.*, 2005; RANGEL *et al.*, 2007; DEL-CLARO; TOREZAN-SILINGARDI, 2019).

## **2.4 *Campomanesia Pubescens***

No Estado do Mato Grosso do Sul, a *Campomanesia pubescens* é popularmente conhecida como "guavira". No Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento é catalogada como "gabioba" e suas variantes. O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento tem registro de 14 espécies de "guabirobeira" (BOAS; OESTERREICH, 2021; CARDOSO; CATELAN, 2021).

Essa diversidade permite inúmeras oportunidades de estudos dos potenciais benefícios da planta e seus frutos, incluindo o desenvolvimento de novos produtos e estratégias de uso sustentável que podem contribuir para a preservação e o bem-estar da região (BOLZANI *et al.*, 2012; VALLI; RUSSO; BOLZANI, 2018; ELLWANGER; NOBRE; CHIES, 2022).

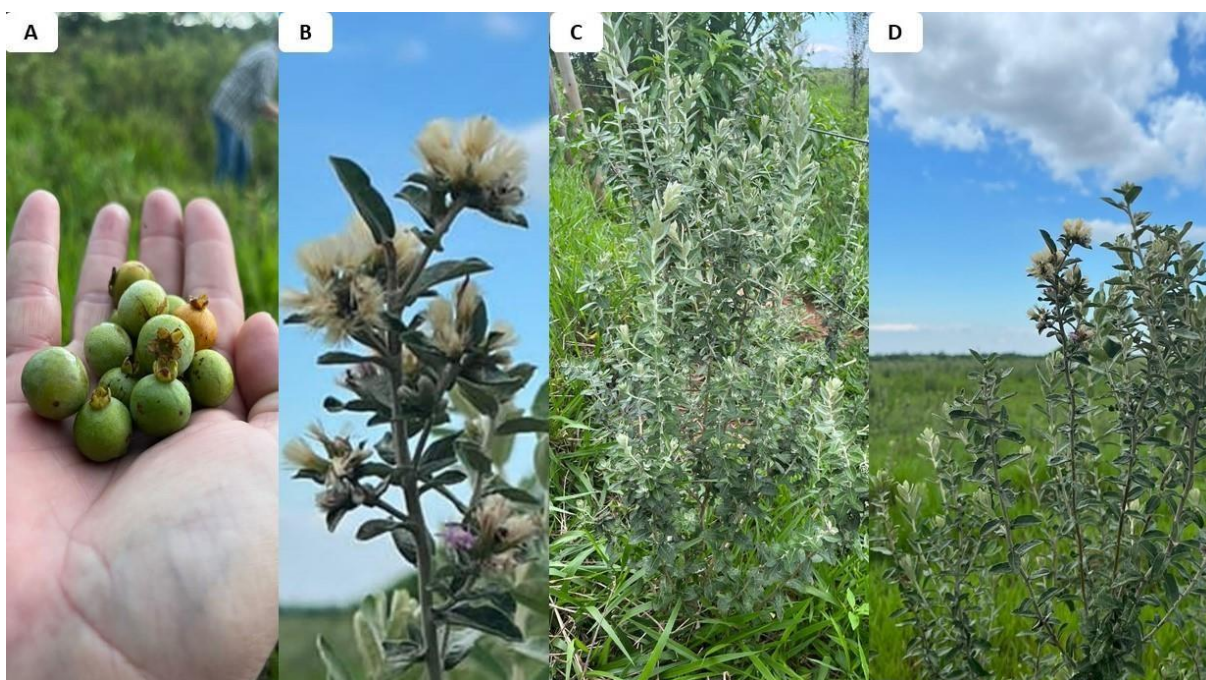
A *Campomanesia pubescens* emerge como um arbusto caducifólio, ou seja, que perde suas folhas em determinadas estações do ano, com altura entre 1 a 2 metros (SILVA *et al.*, 2009).

O caule dessa espécie é piloso, com pedúnculos que sustentam as flores e que exibem uma densa cobertura de pêlos finos conhecida como pubescência. Suas folhas são oblongas e possuem uma membrana pilosa delicada que reveste as duas faces da folha, conferindo-lhe uma textura distinta (SILVA *et al.*, 2009).

As flores são axilares, brancas, com sépalas agudas e triangulares, com bractéolas lineares que as acompanham. Essas características botânicas contribuem para a diversidade ecológica e a fertilização cruzada (CARDOSO; CATELAN, 2021).

Além disso, a *Campomanesia pubescens* destaca-se pela proporção de seus pedúnculos em relação aos brotos florais. Estes pedúnculos revelam um alongamento que supera em comprimento os delicados botões florais que pendem deles. Essa característica facilita a identificação precisa desta espécie (CARDOSO; CATELAN, 2021).

**Imagem 1.** *Campomanesia pubescens* frutos (A), flores (B) e planta (C e D).



Fonte: do autor (2023).

A folhagem da guavira também reserva particularidades. No momento da antese, que é o instante da abertura dos botões florais, as folhas encontram-se em estágio imaturo, um detalhe que distingue a *Campomanesia pubescens*. À medida que essas folhas amadurecem, elas adquirem uma textura coriácea, tornando-se mais duras e resistentes. Na face anterior das folhas maduras, a presença de pelos finos é uma característica adicional que ressalta a singularidade desta planta em relação a outras gabirobeiras (SILVA *et al.*, 2009; CARDOSO; CATELAN, 2021).

**Imagem 2.** Folhas e frutos de *Campomanesia pubescens*



Fonte: do autor (2023).

Essas características não apenas adicionam complexidade à descrição botânica da *Campomanesia pubescens*, mas também desempenham um papel fundamental na diferenciação e identificação dessa espécie valiosa dentro do reino vegetal.

## **2.5 Características fito-químicas do gênero *Campomanesia***

Os metabólitos de origem vegetal, substâncias químicas essenciais para o funcionamento e a sobrevivência das plantas, são divididos em duas principais categorias: metabólitos primários e secundários (ALVES, 2001; VIZZOTTO; KROLOW; WEBER, 2010). Cada planta possui uma composição única desses metabólitos e sua presença ou ausência não é vital para a sobrevivência das células vegetais, mas desempenha papéis significativos

em suas respostas a diversos estímulos ambientais. Os metabólitos primários, que são encontrados em todas as plantas, desempenham funções fundamentais na fotossíntese, respiração, crescimento, desenvolvimento e reprodução das plantas. Eles incluem açúcares, aminoácidos, ácidos nucleicos e outras moléculas essenciais para o funcionamento básico das células vegetais (TAIZ *et al.*, 2021).

Já os metabólitos secundários, que compõem um grupo diversificado e especializado de substâncias químicas, desempenham funções mais específicas, muitas vezes relacionadas à interação da planta com seu ambiente (TAIZ *et al.*, 2021). Esses metabólitos secundários podem ser classificados em três grandes grupos, dependendo de sua rota de biossíntese:

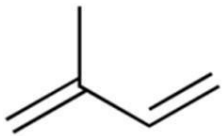
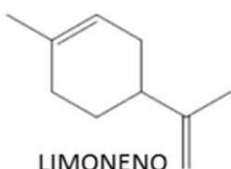
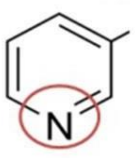
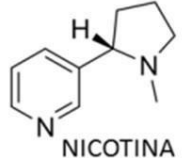
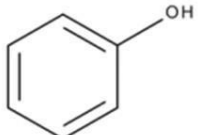
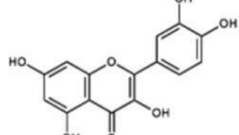
- Terpenos e esteroides: originados a partir de unidades isoprenoídicas, que consistem em cinco átomos de carbono, os terpenos e esteroides são uma classe diversificada de metabólitos que incluem óleos essenciais, como os encontrados em plantas aromáticas, bem como compostos esteroidais importantes para a integridade das membranas celulares (GUIMARÃES *et al.*, 2019; TETALI, 2019; MASYITA *et al.*, 2022; SAINI *et al.*, 2022).

- Alcaloides: são compostos orgânicos que contêm átomos de nitrogênio, geralmente ligados a estruturas cíclicas de cinco ou seis átomos de carbono. Os alcaloides têm uma ampla gama de funções, incluindo defesa contra herbívoros, atraindo polinizadores e atividades farmacológicas em humanos (UZOR, 2020; HEINRICH; MAH; AMIRKIA, 2021; OMAR *et al.*, 2021).

- Compostos fenólicos: são compostos aromáticos que contêm um ou mais grupos hidroxila (-OH) em sua estrutura. Os compostos fenólicos são conhecidos por sua capacidade antioxidante e estão envolvidos em processos de defesa da planta contra estresses bióticos e abióticos (DE LA ROSA *et al.*, 2019; OLSZOWY, 2019; ROCCHETTI *et al.*, 2022).



**Figura 1.** Estrutura básica e exemplo das três classes de metabólitos vegetais secundários.

| CLASSE DE METABÓLITO | ESTRUTURA BÁSICA                                                                              | EXEMPLO                                                                                           |
|----------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|
| TERPENOS             | <br>ISOPRENO | <br>LIMONENO   |
| ALCALOIDES           | <br>N        | <br>NICOTINA   |
| COMPOSTOS FENÓLICOS  | <br>FENOL    | <br>QUERCETINA |

Fonte: adaptado de CROTEAU, KUTCHAN e LEWIS (2009) e HAIDA et al. (2011).

Acredita-se que grande parte das atividades biológicas observadas nas plantas pertencentes ao gênero *Campomanesia* possa ser atribuída à presença e ação de metabólitos secundários específicos. Esses compostos químicos, produzidos pelas plantas, desempenham papéis importantes em suas respostas a estímulos ambientais e interações com outros organismos. Entre os metabólitos secundários identificados nas *Campomanesias*, destacam-se os terpenos, flavonoides, champanonas, taninos e saponinas (DUARTE et al., 2009; CATELAN et al., 2018; VILLAS BOAS et al., 2018b, 2020).

Os terpenos, substâncias químicas orgânicas que frequentemente conferem aroma e sabor a frutas e plantas, têm sido objeto de investigações extensas em laboratórios ao redor do mundo. Sua identificação e isolamento têm permitido uma compreensão mais profunda de como essas substâncias afetam tanto a planta produtora quanto outros organismos que interagem com ela. Terpenos também são conhecidos por suas propriedades aromáticas e medicinais (GUIMARÃES et al., 2019; TETALI, 2019; MASYITA et al., 2022; SAINI et al., 2022)..

Os flavonoides, outro grupo de metabólitos secundários encontrados nas *Campomanesias*, são compostos antioxidantes que desempenham um papel fundamental na proteção das plantas contra o estresse oxidativo e também têm relevância na saúde humana devido às suas propriedades medicinais. Sua identificação e caracterização em *Campomanesias* podem fornecer informações

sobre as propriedades antioxidantes e potenciais benefícios à saúde associados ao consumo dessas plantas (ULLAH *et al.*, 2020; DIAS; PINTO; SILVA, 2021).

Os flavonoides são uma classe importante de compostos fenólicos e têm sido extensivamente pesquisados devido às suas diversas aplicações. A base estrutural dos flavonoides é a 2-fenilbenzopirona, que serve como uma unidade fundamental para a síntese dessa classe de compostos. Esta unidade básica consiste em dois anéis fenólicos, rotulados como anel A e anel B, conectados por uma ponte composta por três átomos de carbono, formando o anel C (ULLAH *et al.*, 2020).

Essa estrutura tríplice, composta pelos anéis A, B e C, é a assinatura distintiva dos flavonoides. Os anéis A e B geralmente contêm grupos hidroxila, conferindo propriedades antioxidantes e outras características bioativas a esses compostos. Devido a essa arquitetura molecular característica, os flavonoides possuem uma vasta gama de atividades biológicas e são frequentemente encontrados em alimentos, plantas medicinais e produtos naturais (ULLAH *et al.*, 2020).

É amplamente reconhecido que os flavonoides desempenham um papel fundamental como antioxidantes, uma vez que têm a capacidade de neutralizar os efeitos nocivos dos radicais livres e proteger as células contra o estresse oxidativo (KARAK, 2019; DIAS; PINTO; SILVA, 2021). No entanto, além de sua ação antioxidante, há evidências substanciais de que esses compostos apresentam atividade biológica em uma variedade de sistemas e processos dentro do organismo.

Um desses sistemas em que os flavonoides demonstraram influenciar é a permeabilidade capilar. Isso significa que eles têm a capacidade de afetar a integridade e a função dos pequenos vasos sanguíneos, o que é relevante em processos como a circulação sanguínea e a resposta inflamatória. Além disso, os flavonoides têm demonstrado impacto em processos secretórios envolvidos na resposta inflamatória do corpo, onde podem modular a liberação de substâncias que desempenham um papel na inflamação e na defesa do organismo (KARAK, 2019; DIAS; PINTO; SILVA, 2021).

Além disso, os flavonoides têm a capacidade de influenciar a atividade de enzimas, receptores e carreadores no corpo. Eles podem interferir com a atividade de certas enzimas, afetando assim várias reações bioquímicas. Também podem interagir com receptores celulares, modulando a resposta a sinais químicos. Além disso, sua capacidade de influenciar carreadores pode afetar o transporte de substâncias em células e tecidos (KARAK, 2019). Essas diversas atividades biológicas dos flavonoides têm sido objeto de investigação em inúmeros estudos científicos, que visam compreender melhor os mecanismos pelos quais esses compostos atuam no

corpo. A pesquisa nesse campo tem relevância não apenas na compreensão dos benefícios para a saúde associados aos flavonoides, mas também no desenvolvimento de aplicações terapêuticas e nutricionais, com o potencial de melhorar a qualidade de vida e a prevenção de doenças.

O estudo desses metabólitos secundários em *Campomanesias* não apenas contribuem para nossa compreensão da química dessas plantas, mas também abrem portas para aplicações potenciais em diversos campos, como na produção de medicamentos, produtos alimentícios e na proteção das plantas em sistemas agrícolas (VERSCHAEVE; VAN STADEN, 2008).

## **2.6 Estudos farmacológicos com *Campomanesia Pubescens***

A investigação dos potenciais efeitos farmacológicos da *Campomanesia pubescens* tem sido um campo de pesquisa relativamente pouco explorado, o que justifica a realização da presente tese. No entanto, é importante observar que estudos envolvendo outras espécies do gênero *Campomanesia* já forneceram evidências de efeitos farmacológicos promissores. Essas descobertas com outras espécies dentro do gênero têm impulsionado o interesse em pesquisar os possíveis benefícios da *Campomanesia pubescens*.

Estudos publicados a respeito do gênero apresentou uma ampla variedade de efeitos farmacológicos para aplicações terapêuticas, tais como atividades antioxidantes (CARDOSO *et al.*, 2008; MARIN *et al.*, 2008; HALDER *et al.*, 2011), anti-inflamatórias (GUIMARÃES *et al.*, 2009), antimicrobianas (JASMINE *et al.*, 2010), até propriedades hipoglicemiantes (BIAVATTI *et al.*, 2004) e hepatoprotetoras (SISODIA; BHATNAGAR, 2009). A diversidade de efeitos farmacológicos observados nas *Campomanesias* sugere um potencial significativo dessas plantas para aplicações terapêuticas.

Com o objetivo de avaliar a toxicidade do extrato hexânico das folhas da *Campomanesia pubescens*, Cardoso e colaboradores (2008) conduziram um estudo que empregou ovos de *Artemia salina* como um modelo de toxicidade. Nesse modelo, os ovos foram colocados em béqueres contendo água marinha artificial, onde permaneceram sob luz e oxigenação por um período de 24 horas. Após essa incubação, aproximadamente 10 larvas recém-eclodidas foram transferidas para frascos contendo concentrações do extrato a 550, 1100 e 2200 µg/mL, previamente dissolvidas em água marinha artificial. Decorridas mais 24 horas, as larvas foram contadas e seus dados foram analisados. Os resultados desse estudo revelaram um perfil de não toxicidade para o extrato hexânico, uma vez que nenhuma morte das larvas de *Artemia salina* foi observada mesmo na concentração mais elevada de 2200 µg/mL.



Guerrero *et al.* (2010), ao investigar o efeito do extrato das folhas de *Campomanesia pubescens* na toxicidade crônica, concluir que as doses de 250mg/kg e 500mg/kg não apresentam sinais de toxicidade. Ao avaliar o efeito do extrato dos frutos na toxicidade, Villas- Boas *et al.* (2018b) também conclui baixa toxicidade com doses de 125mg/kg a 1000mg/kg.

Embora esses estudos tenham fornecido informações sobre a segurança dos extratos para consumo humano, os mesmos não abrangeram o período reprodutivo. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) no Brasil, por exemplo, estabelece diretrizes específicas para a avaliação da segurança de substâncias destinadas ao consumo humano nesse período de vida (ANVISA, 2013).

Essas diretrizes incluem estudos de toxicidade aguda, toxicidade de doses repetidas, toxicidade reprodutiva, genotoxicidade, tolerância local e carcinogenicidade, bem como investigações sobre a farmacocinética e outros parâmetros de segurança (Administração, Distribuição, Metabolismo e Excreção - ADME) (ANVISA, 2013). Conforme necessário, outros estudos relacionados à segurança da substância em questão podem ser requeridos. Os dados resultantes desses estudos desempenham um papel fundamental na preparação das fases subsequentes de pesquisa clínica e na avaliação da segurança de produtos destinados ao consumo humano.

## **2.7 Estresse oxidativo e período gestacional: radicais livres e antioxidantes**

O estresse oxidativo ocorre quando a geração de agentes ou compostos denominados oxidantes estão em desigualdade em relação aos agentes e sistemas do organismo que agem no combate a estes com fim de realizar o equilíbrio basal. Na mitocôndria, no citoplasma e nas membranas celulares é onde ocorre inicialmente o surgimento dos radicais livres. O estresse oxidativo pode ser avaliado pelo quantitativo de radicais livres gerados e produzidos pelo organismo em relação a seus agentes antioxidantes, sendo tais mecanismos auxiliados pela presença de íons ferro e cobre bem como a ação da mitocôndria no transporte de elétrons em sua cadeia de transporte celular (GREEN; BRAND; MURPHY, 2004; LUCCA, 2019).

No período gestacional ocorre um aumento natural e fisiológico das necessidades de nutrientes e oxigênio devido as alterações no organismo materno por consequência do crescimento fetal sobretudo na placenta, gerando assim o denominado estresse metabólico. A gestação por si só é um desafio para o organismo materno que sofre alterações fisiológicas exigindo adaptações bioquímicas e anatômicas, sendo assim este período considerado oxidativo

(TOESCU *et al.*, 2002; LUCCA, 2019).

As reações aeróbicas basais fazem parte do metabolismo, as quais geram radicais livres seja por decorrência de desequilíbrio basal ou disfunção no equilíbrio biológico, ocorrendo após essas reações o desemparelhamento de elétrons na última camada de valência gerando uma instabilidade química onde átomos de oxigênio e nitrogênio apresentam uma elevada capacidade reativa em seus átomos, buscando a estabilidade molecular, produzindo as denominadas ERO- espécies reativas ao oxigênio e ERN- espécie reativas ao nitrogênio (CHATGILIALOGLU; O'NEILL, 2001; WELCH *et al.*, 2002).

Os radicais livres podem ser gerados a partir do metabolismo de ácidos graxos ou situações de baixa demanda de oxigênio, quadros patológicos como infecções e inflamações ou exposição a substâncias tóxicas. Os radicais livres por serem moléculas reativas em contato com DNA celular podem gerar mutações no mesmo propiciando aparecimento de várias patologias, onde este quadro pode causar alterações no período gestacional (CHATGILIALOGLU; O'NEILL, 2001; WELCH *et al.*, 2002; LUCCA, 2019).

Frente a ação deletéria dos radicais livres e possíveis riscos e danos que esses podem ocasionar ao organismo, os agentes antioxidantes tem ação regeneradora para prevenir a reação de oxirredução a nível basal. Os agentes antioxidantes podem ser produzidos pelo corpo ou adquiridos pela dieta compondo o sistema de defesa antioxidante, agindo no impedimento da formação dos radicais livres, inibindo a ação ou propiciando reparação de estruturas afetadas. Entre as substâncias antioxidantes, são exemplos de agentes endógenos a glutathione peroxidase (GPX), DNA glicosilases, superóxido dismutase (SOD) e agentes exógenos a vitamina C (ácido ascórbico), alfa- tocoferol, compostos fenólicos, beta caroteno bem como produtos naturais que possuam tal ação pela presença de metabólitos que gerem esse efeito fisiológico frente aos radicais livres (WELCH *et al.*, 2002; KOURY; DONANGELO, 2003; BARBOSA *et al.*, 2023).

## **2.8 Ensaaios de toxicidade**

No Brasil, a legislação referente a medicamentos fitoterápicos passou por diversas alterações nos últimos anos. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) tem desenvolvido regulamentações específicas para esses medicamentos. A Portaria nº 6 de 1995 estabeleceu prazos para que as indústrias farmacêuticas apresentassem dados de eficácia e segurança de medicamentos fitoterápicos (ANVISA, 1995).

A Portaria nº 18 de 2004 tratou dos registros de medicamentos fitoterápicos (ANVISA,

2004). Em 2006, o decreto que aprovou a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos foi publicado (BRASIL, 2006). Em 2013, foi lançado um guia que regulamenta diversos testes pré-clínicos necessários para o desenvolvimento de medicamentos fitoterápicos (ANVISA, 2013).

As normativas da ANVISA têm como base as diretrizes internacionais de agências de regulamentação e vigilância de medicamentos. Os estudos pré-clínicos de toxicidade seguem as normas da *Environmental Protection Agency* e são recomendados pela *Food and Drug Administration* e pela *Organization for Economic Cooperation and Development* (ANVISA, 2013).

Muitas espécies que possuem propriedades funcionais e/ou medicinais são tradicionalmente utilizadas pela população com base em conhecimentos empíricos. No entanto, é importante ressaltar que o conhecimento popular, por si só, não é suficiente para estabelecer a segurança de uso de uma planta medicinal. De acordo com a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos da Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde a toxicologia desempenha um papel central no desenvolvimento de fitoterápicos (FIGUEREDO; GURGEL; GURGEL JUNIOR, 2014).

Nesse sentido, a realização de ensaios toxicológicos se torna essencial para avaliar os níveis de toxicidade e possíveis efeitos adversos associados ao consumo de qualquer substância (SILVA *et al.*, 2012).

O conceito de toxicidade refere-se à capacidade potencial de uma substância específica em desencadear um estado patológico quando introduzida ou interagindo com o organismo- alvo (KLAASSEN; WATKINS III, 2009).

A problemática da toxicidade, sob a perspectiva dos produtos naturais, tornou-se uma questão de saúde pública. Inúmeros casos documentados de envenenamento relacionados ao uso de plantas vêm sendo registrados na literatura (ANANTHI *et al.*, 2010; SHIN *et al.*, 2011; EKOR, 2014).

Antes de 1996, mais de 5000 suspeitas de reações adversas associadas ao consumo de ervas foram comunicadas à Organização Mundial da Saúde. Entre 1993 e 1998, foram reportados 2621 eventos adversos vinculados ao uso de suplementos dietéticos perante a Food and Drug Administration (FDA). Uma pesquisa no Brasil de 2012 a 2016, com os dados do SINTOX (Sistema Nacional de informações Tóxico-farmacológicas) sugere que a incidência de eventos adversos, especialmente intoxicação, atribuídos ao uso de fitoterápicos ainda é significativo (TEIXEIRA *et al.*, 2020).

Essas intoxicações foram associadas a diversas causas, incluindo o uso terapêutico, a

automedicação, a ingestão acidental, e tentativas de suicídio, homicídio e aborto. É importante salientar que esse número provavelmente é subestimado, uma vez que muitos casos não são registrados ou são notificados como exposição a agentes tóxicos desconhecidos. A falta de obrigatoriedade na notificação de eventos toxicológicos no Brasil contribui para essa subnotificação (CAMPOS *et al.*, 2016).

O alto número de eventos adversos relacionados ao uso de plantas medicinais pode ser atribuído, em grande parte, à crença equivocada de que o que é natural está isento de efeitos tóxicos. Contudo, é amplamente conhecido que muitas plantas contêm constituintes com potencial para desencadear reações adversas, que podem afetar diversos sistemas do organismo, como o fígado, os rins, o coração, a reprodução, o sistema sanguíneo, a pele, o comportamento e até mesmo o ácido desoxirribonucleico (DNA) (TCHAMADEU *et al.*, 2011).

Os testes de toxicidade são uma ferramenta essencial para avaliar ou prever os efeitos tóxicos em sistemas biológicos, além de ajudar a determinar a toxicidade relativa de substâncias. A avaliação pré-clínica permite identificar os efeitos tóxicos em órgãos-alvo, a relação com a dose, o tempo seguro de exposição, a reversibilidade dos efeitos, bem como o período em que os sinais de toxicidade surgem e desaparecem, conforme preconiza a Organização para cooperação e desenvolvimento econômico – OECD (2022).

### **2.8.1 Desenho experimental da toxicidade**

Os animais devem ser observados periodicamente ao longo de 14 dias após receberem a substância teste. Todos os sinais clínicos devem ser sistematicamente anotados, levando-se em conta os cinco parâmetros do screening hipocrático (MALONE; ROBICHAU, 1962):

- Estado Consciente: é avaliado através da observação da atividade geral do animal dentro da caixa;
- Atividade e Coordenação do Sistema Motor: é avaliada através da resposta ao toque, da resposta do aperto da cauda, do endireitamento e da força para agarrar do animal;
- Reflexos: são avaliados através da resposta ao estímulo auricular e corneal;
- Atividades sobre o sistema nervoso central: avaliadas através da observação de tremores, convulsões, cauda em straub, sedação e/ou anestesia;
- Atividades sobre o sistema nervoso autônomo: avaliadas através da observação de lacrimação, cianose, ptose, salivação e/ou piloereção.

Além da observação dos cinco parâmetros hipocráticos, os animais também devem ser

monitorados quanto ao consumo de água e ração e peso corporal. Ao final do período de observação, todos os animais devem ser submetidos à eutanásia e autopsiados (ANVISA, 2013).

### **2.8.2 Desenho experimental da mutação gênica**

No início da década de 80, autoridades de saúde pública e órgãos ambientais em várias nações industrializadas incorporaram a avaliação da mutagenicidade à lista de propriedades tóxicas a serem investigadas antes da introdução de novos medicamentos no mercado. Desde então, uma série de testes foi estabelecida para detectar, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, o potencial mutagênico de compostos (DOLL; PETO, 1981).

Um dos ensaios amplamente aceitos nesse contexto é o teste do micronúcleo, uma avaliação biológica que visa detectar agentes clastogênicos (que causam quebra de cromossomos) e agentes aneugênicos (que induzem aneuploidia ou segregação cromossômica anormal). É considerado um dos ensaios mais robustos na área da mutagenicidade e é amplamente reconhecido por agências regulatórias internacionais (OECD, 2014b).

Esse ensaio tem como princípio avaliar o impacto genético de uma substância em teste na formação de micronúcleos contendo material cromossômico da célula precursora. A presença de micronúcleos indica perda de cromatina devido a danos cromossômicos estruturais ou a problemas no processo mitótico (RIBEIRO; MARQUES; SALVADORI, 2003).

Durante o processo de maturação celular, os eritroblastos na medula óssea transformam-se em eritrócitos policromáticos. Nesse processo, o núcleo da célula é expulso, mas quaisquer micronúcleos formados permanecem na célula. Portanto, um aumento na frequência de eritrócitos policromáticos contendo micronúcleos sugere danos cromossômicos recentemente induzidos e transmitidos (OECD, 2014b).

As principais características desse teste incluem: (1) a observação do efeito da substância em teste nos eritrócitos policromáticos anucleados; (2) a curta vida útil dos eritrócitos policromáticos, o que torna a presença de micronúcleos um indicador de danos cromossômicos recentes; e (3) a facilidade de identificação dos micronúcleos, com uma distribuição claramente definida (RIBEIRO; MARQUES; SALVADORI, 2003).

Visto que o próprio metabolismo celular pode gerar em torno de 1000 lesões diárias no DNA/célula. Desse modo, o ensaio cometa é essencialmente comparativo, sendo imperativa a presença simultânea de controle positivo e negativo (RIBEIRO; MARQUES; SALVADORI, 2003).

## 2.9 Toxicologia reprodutiva

A toxicologia reprodutiva é um campo que investiga efeitos diretos de uma substância sobre o processo de reprodução de mamíferos. A exposição às substâncias tóxicas pode ocorrer em diversos momentos, desde a concepção à amamentação (STINE; BROWN, 2015; CALADO, 2022).

A teratologia é uma área da medicina que estuda as anomalias e malformações que ocorrem durante o desenvolvimento embrionário ou fetal, estudando a origem e mecanismos do desenvolvimento de anomalias (CALADO, 2022).

Atualmente, sabemos que a exposição materna a uma única dose desse medicamento durante a gestação é suficiente para causar danos irreparáveis ao desenvolvimento dos fetos (TACON; AMARAL; TACON, 2017). Os efeitos tóxicos de qualquer substância sobre a fertilidade, geralmente resultam de alterações na função gonadal, no ciclo estral, no comportamento sexual e nas taxas de gravidez (SCHULER-FACCINI; SANSEVERINO; ABEICHE, 2011).

Muitas substâncias que a população faz uso comumente não tiveram uma investigação em segurança farmacológica detalhada, por vezes não apresentam nenhum efeito tóxico ou adverso em seu uso, contudo no período gestacional, embrionário/fetal pode causar teratogenia e complicações para o desenvolvimento fetal e para a mãe por ser período crítico e sensível sobretudo na organogênese (TACON; AMARAL; TACON, 2017; CALADO, 2022). Diversos fatores estão associados a toxicidade reprodutiva, como agentes infecciosos, substâncias químicas, o álcool, agentes físicos e algumas espécies vegetais (SILVEIRA; BANDEIRA; ARRAIS, 2008; SCHULER-FACCINI; SANSEVERINO; ABEICHE, 2011; CALADO, 2022; GIOTTO *et al.*, 2023).

Os testes de avaliação da toxicidade reprodutiva são parte fundamental para a regulamentação de produtos químicos e medicamentos em diversas agências regulatórias (ANVISA, 2013; SILVA *et al.*, 2021). Para melhor compreensão, o teste de toxicidade reprodutiva é tradicionalmente dividido em três segmentos, como explicado por Zhou *et al* (2016):

- Segmento I: Estudo da fertilidade, abrange o período que vai desde o pré-acasalamento até a implantação do blastocisto no útero. Esse segmento permite avaliar a fertilidade e o desempenho reprodutivo dos progenitores;

- Segmento II: Estudo de toxicologia do desenvolvimento, compreende o período crítico da gestação, conhecido como organogênese. Nesse segmento, investigam-se os efeitos embriotóxicos e teratogênicos de substâncias;
- Segmento III: Estudo perinatal e pós-natal, abrange o período desde o final da gestação até a idade adulta no pós-nascimento. Esse segmento permite avaliar as alterações na progênie que foi exposta a substâncias durante o desenvolvimento fetal e lactação.

O compartilhamento genético entre modelos animais e humanos, permite que estudos de toxicidade em espécies não humanas tem alta correlação com o comportamento biológico em seres humanos, possuindo poder preditivo em estudos de toxicidade (STINE; BROWN, 2015). Tanto seres humanos quanto ratos de laboratório compartilham diversas semelhanças em sua fisiologia e comportamento reprodutivo. Essas similaridades não são tão pronunciadas em outras espécies de mamíferos, tornando o rato uma escolha ideal para estudos que envolvam a função reprodutiva e o desenvolvimento (GRAY *et al.*, 2004). Essa constatação realça a relevância crucial desses testes na avaliação do potencial risco de exposição a produtos químicos e medicamentos durante a gravidez.

Além disso, as fêmeas de ratos e seres humanos compartilham um tipo semelhante de placenta, denominada placenta hemocorial. Esse tipo de placenta envolve uma proximidade íntima entre o córion fetal e o sangue materno, permitindo a passagem eficaz de substâncias da circulação materna para o feto (FURUKAWA *et al.*, 2011).

Essa característica é fundamental para o transporte de nutrientes e oxigênio para o feto e para a remoção de produtos de resíduos. No entanto, também torna o feto suscetível à exposição a substâncias nocivas.

Acredita-se que a maioria das substâncias com potencial para causar danos ao sistema reprodutor atue diretamente em níveis metabólicos, interferindo por meio da inibição enzimática, mutações genéticas ou alterações nas divisões celulares. No entanto, essas substâncias também podem exercer efeitos indiretos, afetando a mãe, a placenta ou os vasos umbilicais (BENZECRY *et al.*, 2001).

Dado essas características, diversas substâncias, incluindo plantas medicinais, têm o potencial de aumentar o risco de teratogenicidade (MOURA, 2016).

## 2.10 Plantas Medicinais e Toxicidade reprodutiva

Substâncias tóxicas têm o potencial de causar danos aos órgãos reprodutivos e afetar a gestação, mesmo as com origem vegetal/medicinal. Com base em seus efeitos tóxicos, esses produtos podem ser classificados como abortivos, teratogênicos ou embriotóxicos (RODRIGUES *et al.*, 2011; ABREU DA SILVA; BOTELHO DE SANTANA, 2018; GIOTTO *et al.*, 2023).

O fenômeno reprodutivo como um todo engloba desde a produção dos gametas, fertilização e desenvolvimento embrionário, nascimento e desenvolvimento pós natal até a chegada da maturidade sexual, mediante desenvolvimento da habilidade de procriar (BREUNIG, 2021).

No Brasil, muitas plantas amplamente consumidas na medicina popular estão associadas a processos abortivo (NUNES; SILVA, 2021). Estudos conduzidos com ratas Wistar prenhas revelaram que plantas como *Ruta chalepensis* (GONZALES *et al.*, 2007), *Lantana camara* (MELLO *et al.*, 2005) e *Pfaffia glomerata* (TOLEDO *et al.*, 2004), por exemplo, exibem efeitos que podem ser prejudiciais tanto para a gestante quanto para o feto.

Essas plantas são capazes de estimular a motilidade uterina, levando a situações de aborto (RODRIGUES *et al.*, 2011).

Essa evidência destaca a necessidade de conscientização sobre os riscos associados ao uso indiscriminado de produtos fitoterápicos durante a gravidez e sublinha a importância de orientação médica adequada para garantir a segurança da mãe e do feto (GIOTTO *et al.*, 2023). Todas as plantas mencionadas possuem ampla notoriedade na medicina popular e desempenham funções bem estabelecidas em diferentes áreas da saúde. O grau da toxicidade de um preparado de plantas depende de vários fatores, entre eles a dose e a frequência administrada, em alguns casos baixas dosagens podem acarretar intoxicações devido à sensibilidade biológica individual, gerando desde sensibilização e alergias até intoxicações mais graves (HOLLENBACH, 2013).

Portanto, fica evidente a necessidade de compreensão dos potenciais efeitos adversos de produtos fitoterápicos e fitoquímicos durante a gravidez. Os estudos de toxicidade reprodutiva do gênero *Campomanesia* ainda é extremamente escasso. Viscardi (VISCARDI, 2017) avaliou a toxicidade reprodutiva do óleo essencial e da polpa microencapsulada de *Campomanesia adamantium* e não encontrou evidências de efeito tóxico da sua administração.

Araújo *et al.* (2023) também verificaram que a administração da polpa do fruto de *Campomanesia adamantium* não apresenta efeitos deletérios na toxicidade reprodutiva. Auharek *et al.* (2013) administraram 26.3mg/kg/dia de extrato de *Campomanesia xanthocarpa* durante o



período organogênico e gestacional em ratas Wistar e não encontraram evidências de distúrbios da função reprodutiva nessas condições experimentais. Estudos com extratos de *Campomanesia pubescens* demonstraram segurança na toxicidade (GUERRERO *et al.*, 2010; VILLAS BOAS *et al.*, 2018a, 2018b), entretanto, o seu perfil de toxicidade reprodutiva ainda não foi explorado.

Diante desse cenário, torna-se essencial compreender os possíveis efeitos reprodutivos adversos associados ao consumo de *Campomanesia pubescens*, a fim de evitar riscos tanto para a mãe quanto para o feto. Dessa forma, torna-se imperativo investigar como extratos medicinais e de uso tradicional podem afetar o curso da gravidez e o desenvolvimento embrionário e fetal, contribuindo para a tomada de decisões informadas em relação ao uso de substâncias durante a gestação.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Avaliar a toxicidade do extrato etanólico dos frutos da *Campomanesia pubescens* em modelo experimental de toxicidade reprodutiva no período pré-natal.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Avaliar em fêmeas Wistar prenhas tratadas com *Campomanesia pubescens*, seus efeitos embriotóxicos e teratogênicos no período da organogênese;
- Investigar os efeitos mutagênicos do consumo de *Campomanesia pubescens* em fêmeas Wistar prenhas por meio do ensaio do micronúcleo durante o período pré-natal;

#### 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU DA SILVA, A. C.; BOTELHO DE SANTANA, L. L. Os riscos do uso de plantas medicinais durante o período gestacional: uma revisão bibliográfica. *Acta toxicológica argentina*, v. 26, n. 3, p. 118–123, 2018.
- AL-EDANY, T. Y.; AL-SAADI, S. A. A. M. Taxonomic Significance of Anatomical Characters in Some Species of the Family Myrtaceae. *American Journal of Plant Sciences*, v. 03, n. 05, p. 572–581, 2012. Disponível em: <<http://www.scirp.org/journal/doi.aspx?DOI=10.4236/ajps.2012.35069>>.
- ALVES, H. de M. A diversidade química das plantas como fonte de fitofármacos. *Cadernos temáticos de química nova na escola*, v. 3, p. 10–15, 2001.
- ANANTHI, R. et al. Genotoxic and antigenotoxic effects of *Hemidesmus indicus* R. Br. root extract in cultured lymphocytes. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 127, n. 2, p. 558–560, fev. 2010. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378874109006916>>.
- ANVISA, B. Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos. *Anvisa, Brasília. ALP, H*, p. 970–975, 2013.
- ARAÚJO, L. C. A. et al. *Campomanesia adamantium* O Berg. fruit, native to Brazil, can protect against oxidative stress and promote longevity. *PLOS ONE*, v. 18, n. 11, p. e0294316, 16 nov. 2023. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0294316>>.
- AUHAREK, S. A. et al. Reproductive toxicity of *Campomanesia xanthocarpa* (Berg.) in female Wistar rats. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 148, n. 1, p. 341–343, jun. 2013. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378874113002626>>.
- AWUCHI, C. G. Medicinal plants: the medical, food, and nutritional biochemistry and uses. *International Journal of Advanced Academic Research*, v. 5, n. 11, p. 220–241, 2019.
- BARBOSA, A. S. et al. Uso de plantas medicinais nativas do cerrado pela população idosa da região oeste do estado da Bahia: Um estudo etnofarmacobotânico. *Revista Eletrônica Acervo Saúde*, v. 23, n. 4, p. e13062, 24 abr. 2023. Disponível em: <<https://acervomais.com.br/index.php/saude/article/view/13062>>.
- BIAVATTI, M. et al. Preliminary studies on *Campomanesia xanthocarpa* (Berg.) and *Cuphea carthagenensis* (Jacq.) J.F. Macbr. aqueous extract: weight control and biochemical parameters. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 93, n. 2–3, p. 385–389, ago. 2004. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378874104002053>>.
- BOAS, G. R. V.; OESTERREICH, S. A. Aspectos farmacológicos, toxicológicos, químicos e culturais da guavira (*Campomanesia pubescens*): uma revisão sistemática. *Rev Bras Plantas Med/Braz J Med Plants*, v. 23, p. 20–29, 2021.
- BOLZANI, V. da S. et al. Natural products from Brazilian biodiversity as a source of new models for medicinal chemistry. *Pure and Applied Chemistry*, v. 84, n. 9, p. 1837–1846, 26 Jul. 2012.

Disponível em: <<https://www.degruyter.com/document/doi/10.1351/PAC-CON-12-01-11/html>>.

BRAGA, J. C. B.; SILVA, L. R. da. Consumo de plantas medicinais e fitoterápicos no Brasil: perfil de consumidores e sua relação com a pandemia de COVID-19 / Consumption of medicinal plants and herbal medicines in Brazil: consumer profile and its relationship with the COVID-19 pandemic. *Brazilian Journal of Health Review*, v. 4, n. 1, p. 3831–3839, 2021.

Disponível em:

<<https://www.brazilianjournals.com/index.php/BJHR/article/view/25393/20265>>.

BREUNIG, R. L. Avaliação da toxicidade crônica e reprodutiva da oleuropeína (Segmento I) em ratos Wistar. 2021.

CALADO, A. M. História da Teratologia. *História da Ciência e Ensino: construindo interfaces*, v. 25, p. 305–319, 29 set. 2022. Disponível em:

<<https://revistas.pucsp.br/index.php/hcensino/article/view/57954>>.

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

<[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1516-05722016000500373&lng=pt&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-05722016000500373&lng=pt&tlng=pt)>.

CARDOSO, C. A. L. et al. Assessment of antioxidant activity, toxicity and chemical composition by GC-MS of the hexane extract from the leaves of *Campomanesia pubescens*. *Revista de ciências farmacêuticas básica e aplicada*, v. 29, n. n3, p. 297–301, 2008.

CARDOSO, C. A. L.; CATELAN, T. B. S. *Campomanesia adamantium*, *C. pubescens*, *C. xanthocarpa*, *C. guazumifolia* and *C. sessiliflora*. In: *Fruits of the Brazilian Cerrado*. Cham: Springer International Publishing, 2021. p. 35–52.

CARDOZO, C. et al. Therapeutic Potential of Brazilian Cerrado *Campomanesia* Species on Metabolic Dysfunctions. *Molecules*, v. 23, n. 9, p. 2336, 13 set. 2018. Disponível em:

<<http://www.mdpi.com/1420-3049/23/9/2336>>.

CARRASCO, F. R. et al. Immunomodulatory activity of *Zingiber officinale* Roscoe, *Salvia officinalis* L. and *Syzygium aromaticum* L. essential oils: evidence for humor- and cell-mediated responses. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 61, n. 7, p. 961–967, 8 Jan. 2010. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jpp/article/61/7/961-967/6136041>>.

CARVALHO, A. P. A. de; CONTE-JUNIOR, C. A. Health benefits of phytochemicals from Brazilian native foods and plants: Antioxidant, antimicrobial, anti-cancer, and risk factors of metabolic/endocrine disorders control. *Trends in Food Science & Technology*, v. 111, p. 534–548, maio 2021. Disponível em:

<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924224421001904>>.

CATELAN, T. B. S. et al. Cytotoxicity, Genotoxicity, Antioxidant Potential and Chemical Composition of Leaves of *Campomanesia pubescens* (Mart. ex DC.) O. Berg. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, v. 19, n. 5, p. 416–421, 20 ago. 2018. Disponível em:

<<http://www.eurekaselect.com/163213/article>>.

CHANG, R. et al. Essential oil composition and antioxidant and antimicrobial properties of *Campomanesia pubescens* O. Berg, Native of Brazilian Cerrado. *Lat. Am. J. Pharm*, v. 30, n. 9 LB-chang2011essential, p. 1843–1848, 2011.

CHATGILIALOGLU, C.; O'NEILL, P. Free radicals associated with DNA damage. *Experimental Gerontology*, v. 36, n. 9, p. 1459–1471, set. 2001. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0531556501001322>>.

COUTINHO, I. D. et al. Determination of phenolic compounds and evaluation of antioxidant capacity of *Campomanesia adamantium* leaves. *Eclética Química*, v. 33, n. 4, p. 53–60, dez. 2008. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-46702008000400007&lng=en&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-46702008000400007&lng=en&tlng=en)>.

CROTEAU, R.; KUTCHAN, T. M.; LEWIS, N. G. Natural products (secondary metabolites). *Biochemistry and molecular biology of plants*, v. 24, p. 1250–1319, 2009.

CRUZ, A. V. de M.; KAPLAN, M. A. C. Uso medicinal de espécies das famílias Myrtaceae e Melastomataceae no Brasil. *Floresta e ambiente*, v. 11, n. 1, p. 47–52, 2012.

DA SILVA, É. R. S. et al. Anti-inflammatory Evaluation and Toxicological Analysis of *Campomanesia xanthocarpa* Berg. *Inflammation*, v. 39, n. 4, p. 1462–1468, 7 ago. 2016. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s10753-016-0378-3>>.

DE LA ROSA, L. A. et al. Phenolic Compounds. In: *Postharvest Physiology and Biochemistry of Fruits and Vegetables*. [s.l.] Elsevier, 2019. p. 253–271.

DE PAULO FARIAS, D. et al. A critical review of some fruit trees from the Myrtaceae family as promising sources for food applications with functional claims. *Food Chemistry*, v. 306, p. 125630, fev. 2020. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814619317558>>.

DEL-CLARO, K.; TOREZAN-SILINGARDI, H. M. The study of biotic interactions in the Brazilian Cerrado as a path to the conservation of biodiversity. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 91, n. suppl 3, 2019. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0001-37652019000600614&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0001-37652019000600614&tlng=en)>.

DIAS, M. C.; PINTO, D. C. G. A.; SILVA, A. M. S. Plant Flavonoids: Chemical Characteristics and Biological Activity. *Molecules*, v. 26, n. 17, p. 5377, 4 set. 2021. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1420-3049/26/17/5377>>.

DRESCH, D. M. et al. Initial growth of *Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg. seedlings on substrates with different compositions and water retention capacities. *Bioscience Journal*, v. 32, n. 1, p. 1–10, 2016.

DUARTE, L. D. S. et al. *Campomanesia* genus – a literature review of nonvolatile secondary metabolites, phytochemistry, popular use, biological activities, and toxicology. *Eclética Química Journal*, v. 45, n. 2, p. 12, 1 abr. 2020. Disponível em: <<https://revista.iq.unesp.br/ojs/index.php/ecletica/article/view/1091>>.

DUARTE, W. F. et al. Indigenous and inoculated yeast fermentation of gabioba (*Campomanesia*

pubescens) pulp for fruit wine production. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, v. 36, n. 4, p. 557–569, 4 abr. 2009. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jimb/article/36/4/557-569/5993832>>.

DUTRA, R. M. S.; SOUZA, M. M. O. de. Cerrado, revolução verde e a evolução no consumo de agrotóxicos. *Sociedade & Natureza*, v. 29, n. 3, p. 469–484, 20 dez. 2017. Disponível em: <<http://www.seer.ufu.br/index.php/sociedadennatureza/article/view/36367>>.

EKOR, M. The growing use of herbal medicines: issues relating to adverse reactions and challenges in monitoring safety. *Frontiers in Pharmacology*, v. 4, 2014. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fphar.2013.00177/abstract>>.

ELLWANGER, J. H.; NOBRE, C. A.; CHIES, J. A. B. Brazilian Biodiversity as a Source of Power and Sustainable Development: A Neglected Opportunity. *Sustainability*, v. 15, n. 1, p. 482, 28 dez. 2022. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2071-1050/15/1/482>>.

FERNANDES, G. W. et al. Biodiversity and ecosystem services in the Campo Rupestre: A road map for the sustainability of the hottest Brazilian biodiversity hotspot. *Perspectives in Ecology and Conservation*, v. 18, n. 4, p. 213–222, 1 out. 2020. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/np068054v>>.

FERREIRA, G. B. et al. Strict protected areas are essential for the conservation of larger and threatened mammals in a priority region of the Brazilian Cerrado. *Biological Conservation*, v. 251, p. 108762, nov. 2020. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S000632072030820X>>.

FERREIRA, L. C. et al. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Campomanesia adamantium*. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 145, n. 1, p. 100–108, Jan. 2013. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378874112007349>>.

FIGUEREDO, C. A. de; GURGEL, I. G. D.; GURGEL JUNIOR, G. D. A Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos: construção, perspectivas e desafios. *Physis: Revista de Saúde Coletiva*, v. 24, n. 2, p. 381–400, 2014. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0103-73312014000200381&lng=pt&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-73312014000200381&lng=pt&tlng=pt)>.

GIOTTO, A. C. et al. Uso indiscriminado de plantas medicinais embriotóxicas e abortivas na gestação. *Revista Acadêmica Saúde e Educação FALOG*, v. 1, n. 01, 2023.

GONZALES, J. et al. Efecto embriotóxico y teratogénico de *Ruta chalepensis* L. «ruda», en ratón (*Mus musculus*). *Revista peruana de biología*, v. 13, n. 3, p. 223–226, 2007.

GORRIL, L. E. et al. Risco das plantas medicinais na gestação: uma revisão dos dados de acesso livre em língua portuguesa. *Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR*, v. 20, n. 1, 29 jul. 2016. Disponível em: <<https://ojs.revistasunipar.com.br/index.php/saude/article/view/5515>>.

GREEN, K.; BRAND, M. D.; MURPHY, M. P. Prevention of Mitochondrial Oxidative Damage as a Therapeutic Strategy in Diabetes. *Diabetes*, v. 53, n. suppl\_1, p. S110–S118, 1 fev. 2004. Disponível em:

<[https://diabetesjournals.org/diabetes/article/53/suppl\\_1/S110/11614/Prevention-of-Mitochondrial-Oxidative-Damage-as-a](https://diabetesjournals.org/diabetes/article/53/suppl_1/S110/11614/Prevention-of-Mitochondrial-Oxidative-Damage-as-a)>.

GRESSLER, E.; PIZO, M. A.; MORELLATO, L. P. C. Polinização e dispersão de sementes em Myrtaceae do Brasil. *Revista Brasileira de Botânica*, v. 29, n. 4, p. 509–530, dez. 2006. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-84042006000400002&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-84042006000400002&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt)>.

GUERRERO, F. M. G. et al. Investigação da toxicidade crônica das folhas de guavira (*Campomanesia pubescens*) em ratos machos. *Revista Fitos*, v. 5, n. 2 LB-guerrero2010investigacao, p. 64–72, 2010.

GUIMARÃES, A. C. et al. Antibacterial Activity of Terpenes and Terpenoids Present in Essential Oils. *Molecules*, v. 24, n. 13, p. 2471, 5 jul. 2019. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1420-3049/24/13/2471>>.

GUIMARÃES, A. G. et al. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of the essential oil of *Eugenia candolleana* DC., Myrtaceae, on mice. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 19, n. 4, p. 883–887, dez. 2009. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0102-695X2009000600016&lng=en&nrm=iso&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-695X2009000600016&lng=en&nrm=iso&tlng=en)>.

HAIDA, K. S. et al. Compostos Fenólicos Totais E Atividade Antioxidante De Duas Variedades De Goiaba E Arruda Phenolic Compounds And Antioxidant Activity Of Two Varieties Of Guava And Rue. *Revista de Atenção à Saúde*, v. 9, n. 28, 2011.

HALDER, S. et al. Clove Oil Reverses Learning and Memory Deficits in Scopolamine- Treated Mice. *Planta Medica*, v. 77, n. 08, p. 830–834, 14 maio 2011. Disponível em: <<http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-0030-1250605>>.

HEINRICH, M.; MAH, J.; AMIRKIA, V. Alkaloids Used as Medicines: Structural Phytochemistry Meets Biodiversity—An Update and Forward Look. *Molecules*, v. 26, n. 7, p. 1836, 25 mar. 2021. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1420-3049/26/7/1836>>.

HOLLENBACH, C. B. Estudo da toxicidade reprodutiva do óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare* L.) em ratos wistar. 2013.

JASMINE, R. et al. Activity of *Eugenia jambolana*, an ethnomedical plant, against drug- resistant bacteria. *Pharmaceutical Biology*, v. 48, n. 4, p. 405–410, 15 abr. 2010. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/13880200903150401>>.

JUNGLOS, F. S. et al. Recovery of the photosynthetic capacity of *Campomanesia adamantium* (Myrtaceae) after water deficit. *Brazilian Journal of Botany*, v. 39, n. 2, p. 541– 546, 5 jun. 2016. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s40415-016-0275-x>>.

KARAK, P. Biological activities of flavonoids: An overview. *Int. J. Pharm. Sci. Res*, v. 10, n. 4, p. 1567–1574, 2019.

KHAN, M. F. et al. The Reproductive Toxicity Associated with *Dodonaea viscosa*, a Folk Medicinal Plant in Saudi Arabia. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, v.

2021, p. 1–9, 15 Jan. 2021. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/ecam/2021/6689110/>>.

KLAASSEN, C. D.; WATKINS III, J. B. *Fundamentos em Toxicologia de Casarett e Doull (Lange)*. [s.l.] AMGH Editora, 2009.

KOURY, J. C.; DONANGELO, C. M. Zinco, estresse oxidativo e atividade física. *Revista de Nutrição*, v. 16, n. 4, p. 433–441, dez. 2003. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1415-52732003000400007&lng=pt&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-52732003000400007&lng=pt&tlng=pt)>.

KUMAR, C. H. et al. Antidiabetic activity of a polyherbal preparation. *Pharmacologyonline*, v. 2, n. 1, p. 780–787, 2010.

LUCCA, L. de. *Estudo longitudinal do perfil oxidativo em gestantes saudáveis e com complicações gestacionais* Universidade Federal de Santa Maria, , 2019.

MACHADO, M. et al. Effects of Essential Oils on the Growth of Giardia lamblia Trophozoites. *Natural Product Communications*, v. 5, n. 1, p. 1934578X1000500, 1 jan. 2010. Disponível em: <<http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1934578X1000500132>>.

MADALOSSO, R. C. Avaliação da toxicidade aguda e da atividade gastroprotetora de extratos de Campomanesia lineatifolia Ruiz & Pav. em roedores. 2011.

MARIN, R. et al. Volatile components and antioxidant activity from some Myrtaceous fruits cultivated in Southern Brazil. *Latin American Journal of Pharmacy*, v. 27, n. 2, p. 172, 2008.

MARQUES, N.; FAZITO, M.; CUNHA, A. Tourism development discourse dynamics in a context of conflicts between mining and nature conservation in the Brazilian Cerrado Hotspot. *Journal of Sustainable Tourism*, v. 30, n. 11, p. 2574–2594, 2 Nov. 2022. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/09669582.2021.1914066>>.

MASYITA, A. et al. Terpenes and terpenoids as main bioactive compounds of essential oils, their roles in human health and potential application as natural food preservatives. *Food Chemistry: X*, v. 13, p. 100217, mar. 2022. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2590157522000153>>.

MELLO, F. B. et al. Effects of Lantana camara (Verbenaceae) on general reproductive performance and teratology in rats. *Toxicon*, v. 45, n. 4, p. 459–466, mar. 2005. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0041010104005008>>.

MELO-REIS, P. et al. Assessment of the mutagenic and antimutagenic activity of Synadenium umbellatum Pax latex by micronucleus test in mice. *Brazilian Journal of Biology*, v. 71, n. 1, p. 169–174, fev. 2011. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1519-69842011000100024&lng=en&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1519-69842011000100024&lng=en&tlng=en)>.

MOREIRA-ARAÚJO, R. S. dos R. et al. Bioactive compounds and antioxidant activity three fruit species from the Brazilian Cerrado. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 41, n. 3, 2019. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-29452019000300901&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-29452019000300901&tlng=en)>.



MYERS, N. et al. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, v. 403, n. 6772, p. 853–858, fev. 2000. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/35002501>>.

NUNES, A. M. M.; SILVA, V. A. O uso de plantas abortivas no nordeste brasileiro: uma revisão. *Ethnoscintia - Brazilian Journal of Ethnobiology and Ethnoecology*, v. 6, n. 2, p. 100, 7 maio 2021. Disponível em: <<https://periodicos.ufpa.br/index.php/ethnoscintia/article/view/10368>>.

OECD, O. for economic cooperation and development. *Test No. 425: Acute Oral Toxicity: Up-and-Down Procedure*. [s.l.] OECD, 2022.

OLIVEIRA, A. et al. Ethnobotany and traditional medicine of the inhabitants of the Pantanal Negro sub-region and the raizeiros of Miranda and Aquidauna, Mato Grosso do Sul, Brazil. *Brazilian Journal of Biology*, v. 71, n. 1 suppl 1, p. 283–289, abr. 2011. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1519-69842011000200007&lng=en&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1519-69842011000200007&lng=en&tlng=en)>.

OLSZOWY, M. What is responsible for antioxidant properties of polyphenolic compounds from plants? *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 144, p. 135–143, Nov. 2019. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0981942819303833>>.

OMAR, F. et al. Plant-Based Indole Alkaloids: A Comprehensive Overview from a Pharmacological Perspective. *Molecules*, v. 26, n. 8, p. 2297, 15 abr. 2021. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1420-3049/26/8/2297>>.

PEREIRA, M. C. et al. Characterization and Antioxidant Potential of Brazilian Fruits from the Myrtaceae Family. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 60, n. 12, p. 3061–3067, 28 mar. 2012. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf205263f>>.

RANGEL, T. F. L. V. B. et al. Human development and biodiversity conservation in Brazilian Cerrado. *Applied Geography*, v. 27, n. 1, p. 14–27, Jan. 2007. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S014362280600021X>>.

RIBAS-SANTOS, C. M.; SANTOS, M.; GUERRA, M. P. Development of floral structures of *Campomanesia xanthocarpa* (Myrtaceae). *Acta Horticulturae*, n. 1231, p. 67–74, Jan. 2019. Disponível em: <[https://www.actahort.org/books/1231/1231\\_12.htm](https://www.actahort.org/books/1231/1231_12.htm)>.

RIBEIRO, L. R.; MARQUES, E. K.; SALVADORI, D. M. F. *Mutagênese ambiental*. [s.l.] Editora da ULBRA, 2003.

RIBEIRO, M. C. et al. The Brazilian Atlantic Forest: a shrinking biodiversity hotspot. *Biodiversity hotspots: distribution and protection of conservation priority areas*, p. 405–434, 2011.

RIBEIRO NETO, J. A. et al. Using the plants of Brazilian Cerrado for wound healing: From traditional use to scientific approach. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 260, p. 112547, out. 2020. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S037887411834306X>>.

ROCCHETTI, G. et al. Functional implications of bound phenolic compounds and phenolics–food interaction: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, v. 21, n.

- 2, p. 811–842, 12 mar. 2022. Disponível em:  
<<https://ift.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/1541-4337.12921>>.
- ROCHA, L. P. B. da et al. Uso de plantas medicinais: Histórico e relevância. *Research, Society and Development*, v. 10, n. 10, p. e44101018282, 5 ago. 2021. Disponível em:  
<<https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/18282>>.
- RODRIGUES, H. G. et al. Efeito embriotóxico, teratogênico e abortivo de plantas medicinais. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, v. 13, n. 3, p. 359–366, 2011. Disponível em:  
<[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1516-05722011000300016&lng=pt&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-05722011000300016&lng=pt&tlng=pt)>.
- SAINI, R. K. et al. Bioactive Compounds of Citrus Fruits: A Review of Composition and Health Benefits of Carotenoids, Flavonoids, Limonoids, and Terpenes. *Antioxidants*, v. 11, n. 2, p. 239, 26 jan. 2022. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2076-3921/11/2/239>>.
- SCHULER-FACCINI, L.; SANSEVERINO, M. T. V.; ABEICHE, A. M. Manual de teratogênese em humanos. In: *Manual de teratogênese em humanos*. [s.l: s.n.]p. 430.
- SHIN, I. S. et al. Genotoxicity assessment of Pyungwi-san (PWS), a traditional herbal prescription. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 133, n. 2, p. 696–703, Jan. 2011. Disponível em:  
<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378874110007609>>.
- SIDHU, M. C.; SHARMA, T. Medicinal plants from twelve families having antidiabetic activity: a review. *Am. J. PharmTech Res*, v. 3, p. 36–52, 2013.
- SILVA, E. P. da et al. Caracterização física, química e fisiológica de gabioba (*Campomanesia pubescens*) durante o desenvolvimento. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 29, n. 4, p. 803–809, dez. 2009. Disponível em:  
<[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0101-20612009000400016&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20612009000400016&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt)>.
- SILVA, E. R. da et al. Toxicological and pharmacological evaluation of *Discaria americana* Gillies & Hook (Rhamnaceae) in mice. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 48, n. 2, p. 273–280, jun. 2012. Disponível em:  
<[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1984-82502012000200011&lng=en&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1984-82502012000200011&lng=en&tlng=en)>.
- SILVA, M. G. da et al. A importância dos ensaios de toxicidade para o desenvolvimento e o registro de fitoterápicos no Brasil. *Research, Society and Development*, v. 10, n. 12, p. e538101220137, 30 set. 2021. Disponível em:  
<<https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/20137>>.
- SILVA, N. C. S. et al. A utilização de plantas medicinais e fitoterápicos em prol da saúde. *Única cadernos acadêmicos*, v. 3, n. 1, 2017.
- SILVEIRA, P. F. da; BANDEIRA, M. A. M.; ARRAIS, P. S. D. Farmacovigilância e reações adversas às plantas medicinais e fitoterápicos: uma realidade. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 18, n. 4, p. 618–626, dez. 2008. Disponível em:  
<[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0102-](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-)

695X2008000400021&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt>.

SISODIA, S.; BHATNAGAR, M. Hepatoprotective activity of *Eugenia jambolana* Lam. in carbon tetrachloride treated rats. *Indian Journal of Pharmacology*, v. 41, n. 1, p. 23, 2009. Disponível em: <<http://www.ijp-online.com/text.asp?2009/41/1/23/48888>>.

STINE, K. E.; BROWN, T. M. *Principles of toxicology*. [s.l.] Crc Press, 2015.

TACON, F. S. de A.; AMARAL, W. N. do; TACON, K. C. B. Medicamentos e gravidez: Influência na morfologia fetal. *Revista Educação em Saúde*, v. 5, n. 2, p. 105, 18 dez. 2017. Disponível em: <<http://revistas.unievangelica.edu.br/index.php/educacaoemsaude/article/view/2653>>.

TAIZ, L. et al. *Fundamentos de Fisiologia Vegetal-6*. [s.l.] Artmed Editora, 2021.  
TEIXEIRA, J. P. da S. et al. Epidemiological profile of cases of intoxication by medicinal plants in brazil from 2012 to 2016. *Brazilian Journal of Development*, v. 6, n. 10, p. 82199– 82209, 2020. Disponível em: <<https://www.brazilianjournals.com/index.php/BRJD/article/view/18903/15200>>.

TETALI, S. D. Terpenes and isoprenoids: a wealth of compounds for global use. *Planta*, v. 249, n. 1, p. 1–8, 22 jan. 2019. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00425-018-3056-x>>.

TOESCU, V. et al. Oxidative stress and normal pregnancy. *Clinical Endocrinology*, v. 57, n. 5, p. 609–613, 22 nov. 2002. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1365-2265.2002.01638.x>>.

TOLEDO, M. R. S. et al. Extratos aquosos de *Pfaffia glomerata* S. e seu efeito tóxico em ratas prenhes. *Revista Horticultura Brasileira*, v. 22, n. 2, p. 493, 2004.

TUROLLA, M. S. dos R.; NASCIMENTO, E. de S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 42, n. 2, p. 289–306, jun. 2006. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1516-93322006000200015&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-93322006000200015&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt)>.

ULLAH, A. et al. Important Flavonoids and Their Role as a Therapeutic Agent. *Molecules*, v. 25, n. 22, p. 5243, 11 nov. 2020. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1420-3049/25/22/5243>>.

UZOR, P. F. Alkaloids from Plants with Antimalarial Activity: A Review of Recent Studies. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, v. 2020, p. 1–17, 12 fev. 2020. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/ecam/2020/8749083/>>.

VALLI, M.; RUSSO, H. M.; BOLZANI, V. S. The potential contribution of the natural products from Brazilian biodiversity to bioeconomy. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 90, n. 1 suppl 1, p. 763–778, 16 abr. 2018. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0001-37652018000200763&lng=en&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0001-37652018000200763&lng=en&tlng=en)>.

VALLILO, M. I. et al. Características físicas e químicas dos frutos do cambucizeiro (*Campomanesia phaea*). *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 27, n. 2, p. 241–244, ago. 2005. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-29452005000200014&lng=pt&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-29452005000200014&lng=pt&tlng=pt)>.

VERSCHAEVE, L.; VAN STADEN, J. Mutagenic and antimutagenic properties of extracts from South African traditional medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 119, n. 3, p. 575–587, out. 2008. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S037887410800305X>>.

VILLAS BOAS, G. R. et al. Preclinical safety evaluation of the ethanolic extract from *Campomanesia pubescens* (Mart. ex DC.) O. BERG (guavira) fruits: analysis of genotoxicity and clastogenic effects. *Food & Function*, v. 9, n. 7, p. 3707–3717, 2018a. Disponível em: <<http://xlink.rsc.org/?DOI=C8FO01017J>>.

VILLAS BOAS, G. R. et al. Preclinical safety evaluation of the ethanolic extract from guavira fruits (*Campomanesia pubescens* (D.C.) O. BERG) in experimental models of acute and short-term toxicity in rats. *Food and Chemical Toxicology*, v. 118, p. 1–12, ago. 2018b. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0278691518302862>>.

VILLAS BOAS, G. R. et al. The ethanolic extract obtained from *Campomanesia pubescens* (D.C.) O. BERG fruits exerts anxiolytic and antidepressant effects on chronic mild stress model and on anxiety models in Wistar rats: Behavioral evidences. *Nutritional Neuroscience*, v. 23, n. 1, p. 16–26, 2 jan. 2020. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/1028415X.2018.1466513>>.

VISCARDI, D. Z. Investigação da atividade anti-inflamatória, antidepressiva e análise toxicológica de óleo essencial e da polpa microencapsulada de *Campomanesia adamantium*. 2017.

VIZZOTTO, M.; KROLOW, A. C. R.; WEBER, G. E. B. Metabólitos secundários encontrados em plantas e sua importância. 2010.

WELCH, K. D. et al. Deleterious iron-mediated oxidation of biomolecules<sup>1</sup> <sup>1</sup>This article is part of a series of reviews on “Iron and Cellular Redox Status.” The full list of papers may be found on the homepage of the journal. 6 Guest Editor: Mario Comporti. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 32, n. 7, p. 577–583, abr. 2002. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0891584902007608>>.

WILSON, P. G. The families and genera of vascular plants flowering plants. *Eudicots: Sapindales, Cucurbitales, Myrtaceae*, v. 10, 2011.

ZHOU, L. et al. Reproductive Toxicity of Zishen Yutai Pill in Rats: The Fertility and Early Embryonic Development Study (Segment I). *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, v. 2016, p. 1–10, 2016. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/ecam/2016/3175902/>>.

## **5. APÊNDICES**

**Artigo 1: Biochemical characterization and potential biological functions of extracts  
from *Campomanesia Pubescens* – A systematic review**



**Submissão:**

**Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas -  
BLACPMA (Qualis Capes – Medicina II – B2)**

<https://blacpma.ms-editions.cl/index.php/blacpma>

Jacenir Vieira da Silva<sup>1\*</sup> (0000-0003-4549-2590)  
Anahy Arruda Burigato<sup>1\*</sup> (0000-0001-8359-8826)  
Larissa Pires Mueller<sup>1</sup> (0000-0003-0134-7033)  
Silvia Aparecida Oesterreich<sup>1</sup> (0000-0001-5293-6618)

1 Universidade Federal da Grande Dourados, Faculdade de Ciências da Saúde, Dourados,  
Mato Grosso do Sul, Brasil.

**Biochemical characterization and potential biological functions of extracts from *Campomanesia*  
*Pubescens* – A systematic review**

**Caracterización bioquímica y posibles funciones biológicas de extractos de *Campomanesia*  
*Pubescens* – Una revisión sistemática**

Jacenir Vieira da Silva<sup>1\*</sup> (0000-0003-4549-2590)

Anahy Arruda Burigato<sup>1\*</sup> (0000-0001-8359-8826)

Larissa Pires Mueller<sup>1</sup> (0000-0003-0134-7033)

Silvia Aparecida Oesterreich<sup>1</sup> (0000-0001-5293-6618)

1 Universidade Federal da Grande Dourados, Faculdade de Ciências da Saúde, Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil.

Address: Rodovia Dourados/Itahum, Km 12 – Unidade 2. Mail Post: 364. CEP: 79.804-970. Dourados/MS. Brasil.

\*Corresponding author: Jacenir Vieira da Silva [jacenirsilva@ufgd.edu.br](mailto:jacenirsilva@ufgd.edu.br)

**Biochemical characterization and potential biological functions of extracts from *Campomanesia pubescens* – A systematic review**

**Caracterización bioquímica y posibles funciones biológicas de extractos de *Campomanesia pubescens* – Una revisión sistemática**

**Abstract:** This systematic review aimed to synthesize the evidence available in the literature on the biochemical characterization and potential biological effects of *Campomanesia pubescens*. A systematic review was performed following the PRISMA protocol from the following databases: PubMed, Web of Sciences, CENTRAL and Scopus. Studies published until December, 2023, with characterization of *Campomanesia pubescens* compounds and/or experimental studies on the biological effects of the plant were included. The results identified 4,164 studies and 2,127 repeated articles were excluded. After the analysis process, eleven texts were included in the qualitative synthesis. This systematic review showed that different types of extracts from different parts of *Campomanesia pubescens* have a high content of functional compounds with antioxidant, antimicrobial and anti-inflammatory action without any evidence of toxicity and/or genotoxicity.

**Keywords:** Phytotherapies. Brazilian plants. Myrtaceae. Phytomedicine.

**Resumen:** Esta revisión sistemática tuvo como objetivo sintetizar la evidencia disponible en la literatura sobre la caracterización bioquímica y los posibles efectos biológicos de *Campomanesia pubescens*. Se realizó una revisión sistemática siguiendo el protocolo PRISMA de las siguientes bases de datos: PubMed, Web of Sciences, CENTRAL y Scopus. Se incluyeron estudios publicados hasta el diciembre, 2023, con caracterización de compuestos de *Campomanesia pubescens* y/o estudios experimentales sobre los efectos biológicos de la planta. Los resultados identificaron 4.164 estudios y se excluyeron 2.127 artículos repetidos. Luego del proceso de análisis, once textos fueron incluidos en la síntesis cualitativa. Esta revisión sistemática demostró que diferentes tipos de extractos de diferentes partes de *Campomanesia pubescens* tienen un alto contenido de compuestos funcionales con acción antioxidante, antimicrobiana y antiinflamatoria sin evidencia de toxicidad y/o genotoxicidad.

**Palabras clave:** Fitoterapéuticos. Plantas brasileñas. Mirtáceas. Fitomedicina.



## 1. Introduction

In the context of the Brazilian biome, an efficient strategy to develop new natural or pharmaceutical products is to explore the therapeutic potential of native species. *Campomanesia pubescens* (DC) O. Berg (family *Myrtaceae*) known as “gabioba” or “guavira” is a native species found in the Southeast and Midwest regions of the Brazilian Cerrado (Chang et al., 2011; Pradella et al., 2021). The fruits of *Campomanesia pubescens* are used to make liqueurs, juices and sweets. The leaves are used in folk medicine to treat infections, bladder ailments, and gastrointestinal disorders. (Catelan et al., 2018).

Using medicinal plants as an alternative or additional therapeutic resource has significantly increased population behavior (Braga & Silva, 2021). Although synthetic drugs are usually the first choice of treatment for many diseases, they often have undesirable effects. Consequently, the acceptance of alternative medicines, such as medicinal plants and herbal medicines, has increased substantially (Braga & Silva, 2021). Among the medicinal plants, a characteristic of the genus *Campomanesia* is a high content of phenolic compounds and flavonoids. When ripe, the fruits of *Campomanesia pubescens* have a high content of vitamin C and phenolic compounds, including flavanones and chalcones (Duarte et al., 2009; J. R. M. Silva, Cardoso, et al., 2009; Villas Boas, Carvalho dos Santos, et al., 2018).

Despite the widespread use of plants as a medicine and functional food in many cultures, there is often no scientific evidence to support their pharmacological properties and toxic potential (Alves Junior et al., 2022; Guerrero et al., 2010). It is estimated that few natural products of plant origin currently marketed have the safety information that allows their proper use (Alves Junior et al., 2022). Concerning *Campomanesia*, this scenario is no different. Although these species are widely used as food and medicine in folk medicine, studies on the toxicity of many species still need to be made available (M. G. da Silva et al., 2021).

Therefore, this study aimed to synthesize the evidence available in the literature on the biochemical characterization and potential biological effects of *Campomanesia pubescens*. We used the

PRISMA systematic review protocol to address current knowledge on the characterization and effect of *Campomanesia pubescens*.

## **2. Materials and methods**

This systematic review followed the guidelines recommended by the PRISMA protocol (Preferred Reporting Items for Systematic reviews and Meta-Analyses) (Moher et al., 2010).

### **2.1 Search strategy**

A systematic search of studies published until December, 2023 was performed in the electronic databases PubMed, Web of Science, CENTRAL (Cochrane) and Scopus. The search strategy used was built using the following keywords: “*Campomanesia pubescens*” OR *pubescens* OR “Guavira”. No other filters to refine the search were used. Instead, a manual reference check was performed on identified studies.

### **2.2 Inclusion eligibility criteria**

Two independent authors initially evaluated the articles identified by the search strategy and the results were compared. Disagreements were discussed and analyzed until a consensus was reached. Initially, according to the purpose of the review, the titles and abstracts of the studies were reviewed to verify that they met the following eligibility criteria. Eligibility criteria were: (1) use of *Campomanesia pubescens*; (2) Biochemical characterization or experimental model of the plant extract. It was not possible to use the PICOS strategy due to the broad nature of this review and the scarcity of similar studies with *Campomanesia pubescens*.

Studies that did not show the presence of these items when reading the full abstract were excluded. Then, the full text of potentially eligible publications was selected to assess eligibility criteria.

A manual reference check of selected studies was performed to complement study selection. This step was performed to identify potentially eligible studies. For studies with unclear information, the authors were contacted to clarify doubts. Repeat studies (duplicate, triplicate) were excluded using the Mendeley® app

### **2.3 Data extraction**

Data were independently extracted and compared from eligible articles by two researchers. The articles were consulted again to verify the existence of any discrepancies. The following data were extracted: study setting, identified components of *Campomanesia pubescens* extracts and study category (experimental or characterization). Details of the experimental design were extracted; study methodology and main results. Any discrepancies identified were resolved through discussion until consensus was reached.

### **2.4 Data Synthesis**

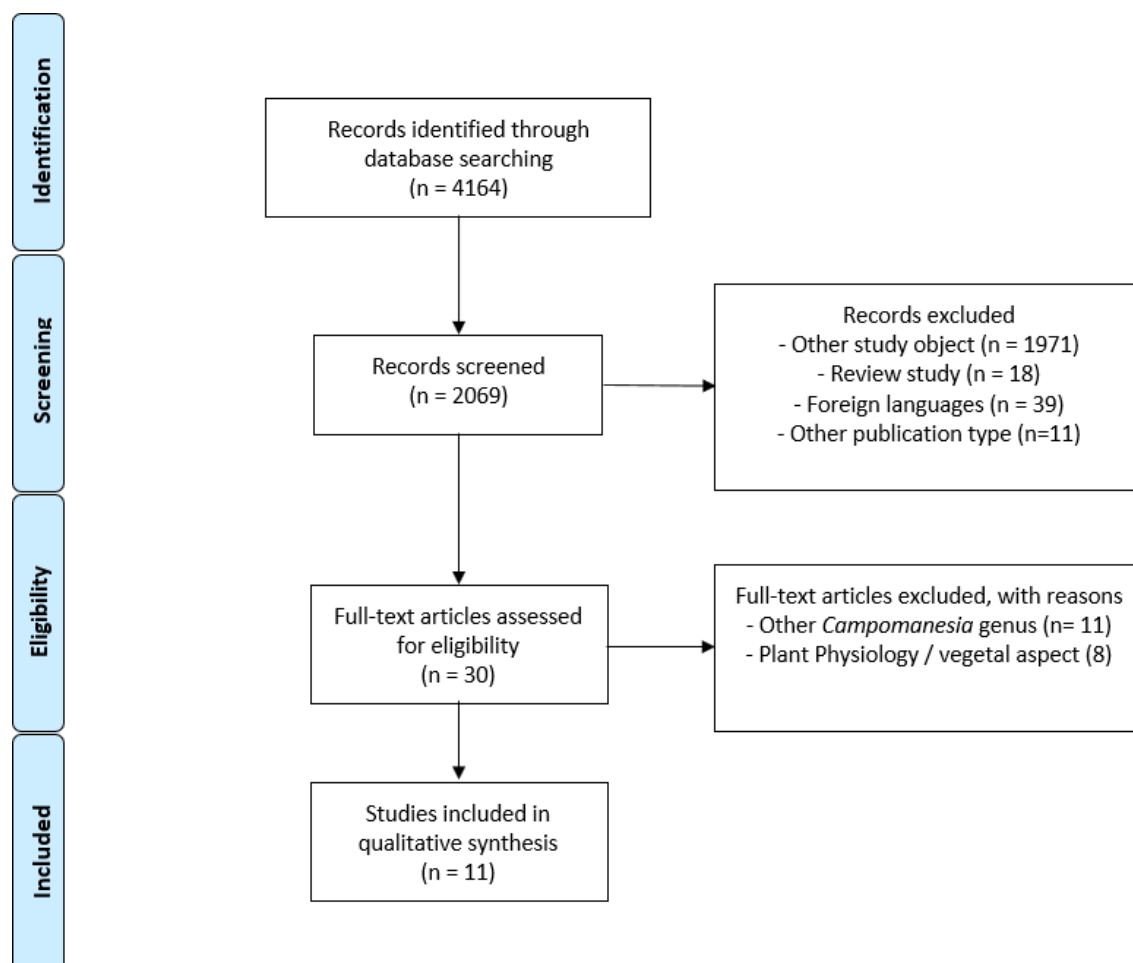
Methodological aspects and differences in the type of extract preparation and/or application showed great variation between studies. It is worth mentioning that the low number of reproducible studies did not allow us to carry out a mathematical synthesis approach, so we carried out a qualitative synthesis of the results, performing a theoretical integration of the results.

## **3. Results**

### **3.1 Search results**

The results of the databases identified a total of 4,164 studies, of which 2,127 repeated articles were excluded. Of the 2,069 remaining studies analyzed, 2,039 were excluded and 30 full texts that matched the inclusion criteria were read in full. After exclusions, eleven studies that fully met the eligibility criteria were included. No additional studies were identified in the manual search of

references in the screening process. It is worth noting that no specific review on the effect of *Campomanesia pubescens* was found among the excluded reviews. The entire selection process is illustrated in Fig. 1.



**Figure 1 - Diagram of the selection processes and inclusion of studies**

### **3.2 Biochemical characteristics of *Campomanesia pubescens***

Of the studies included in this review, 91% reported some biochemical characterization of the extract/product of *Campomanesia pubescens* (Table 1). Only one study reported the experiment's results without any extract characterization (Pradella et al., 2021).

The type of extract varied among several possibilities, among them, the ethanolic extract of leaves (Cardoso et al., 2008; Catelan et al., 2018), ethanolic extract of fruits (Villas Boas et al., 2020; Villas Boas, Carvalho dos Santos, et al., 2018; Villas Boas, Souza de Araújo, et al., 2018) and essential oil from different parts of the plant (Chang et al., 2011; J. R. M. Silva, Cardoso, et al., 2009; J. R. M. Silva, Ré-Poppi, et al., 2009). The study by Duarte *et al.* (2009) was carried out with a fermented beverage (wine) and the study by Cardoso *et al.* (2008) was performed with hexane extracts of leaves. All these reports agree with each other with the presence of high levels of phenolic compounds and flavonoids (Table 1).

**(Table 1 - Biochemical characterization of studies of *Campomanesia Pubescens*)**

**3.3 Potential biological effects of extracts from *Campomanesia pubescens***

The effects division in studies with experimental models was performed in experimental and animal models (table 2 and table 3, respectively). Studies on the biological effect of *Campomanesia pubescens* have yet to be published despite growing national interest. Catelan *et al.* (2018), Chang *et al.* (2011) and Cardoso et al. (2008) demonstrated potential antioxidant effect of three different extract forms (Table 2).

**(Table 2 - Experimental Studies with *Campomanesia pubescens*)**

Studies with animal models are shown in table 3. All studies are in agreement with some beneficial effect of extracts from *Campomanesia pubescens*. Pradella *et al.* (2021) showed that a mixture of ethanolic leaf extract with topical gel can accelerate the healing of topical infection in *Wistar* rats.

Other results in *Wistar* models reinforce the absence of toxic effect or genotoxic effect (Villas Boas, Carvalho dos Santos, et al., 2018; Villas Boas, Souza de Araújo, et al., 2018). Boas *et al.* (2020) showed an antidepressant and anxiolytic effect in stress models. However, due to the scarcity of similar

results that validate these findings (reproduction), these studies only show the potential effects of the plant.

**(Table 3 - Experimental animal models with *Campomanesia pubescens*)**

#### **4. Discussion**

According to the results, this is the first systematic review to specifically focus on the biological effects of *Campomanesia pubescens* extracts. Although studies are still scarce, due to the specific regionality of the species, this synthesis with the effects of extracts of *Campomanesia pubescens* demonstrate that the species has phytotherapeutic potential.

The extracts from different parts of the plant have as main constituents different parts, however, all of them have bioactive substances with the potential to be explored as phytotherapy (Chang et al., 2011). Duarte *et al.* (2009) demonstrated that the fruit pulp is rich in vitamin C (1000 mg / 100g) and hydro and fat-soluble phenolics.

Villas boas *et al.* (2018; 2018) demonstrated that *Campomanesia pubescens* fruit extract has a high content of flavonoids (56.84-58.64 mg of quercetin per gram of extract). Silva (2009) demonstrated that the essential oil of the leaves is rich in limonene (22.4%),  $\alpha$ -pinene (13.3%), sabinene (9.5%), bicyclogermacrene (4.4%) and linalool (3.9%). In the essential oil of the fruits, the main constituents are cryptomeridiol (14.2%), spathulenol (6.7%), globulol (6.2%),  $\alpha$ -cadinol (5.9%) and  $\beta$ -caryophyllene (4, 0%) (Silva et al., 2009). Cardoso *et al.* (2009) demonstrated that the main compounds of the essential oil of fresh flowers are ledol (19.8%), globulol (9.2%),  $\alpha$ -cadinol (7.3%) and epi- $\alpha$ -muurolol (5.0%).

The plant as a whole has a high content of monoterpenes and sesquiterpenes (Cardoso et al., 2008; Cardoso & Ré-Poppi, 2009; Chang et al., 2011; J. R. M. Silva, Cardoso, et al., 2009; J. R. M. Silva, Ré-Poppi, et al., 2009; Villas Boas, Carvalho dos Santos, et al., 2018; Villas Boas, Souza de Araújo, et al., 2018). These compounds alone are being explored for their phytotherapeutic potential

and present scientific evidence of beneficial effects on health (Barros et al., 2022; Nagoor Meeran et al., 2021; Sharma et al., 2019; Verma et al., 2019; Vieira et al., 2018; Zamyad et al., 2019).

Interestingly, the same species in different regions may present different bioactive compositions due to the interaction of plant development with the soil and climate conditions of each region (Chang et al., 2011). This result highlights the need for future research to include chemical characterization in conjunction with biological assays when using *Campomanesia pubescens*.

Although studies with extracts of *Campomanesia pubescens* are still scarce, the studies included in this review show antimicrobial and antioxidant potential with evidence of low toxicity. Chang *et al.* (2011) verified antioxidant effect in different parts of the plant, concluding that the species can be considered a strong natural antioxidant, the same experiment showed antimicrobial potential against aerobic and anaerobic oral pathogens. Other studies reinforce these findings (Cardoso et al., 2008; Catelan et al., 2018; Villas Boas, Carvalho dos Santos, et al., 2018; Villas Boas, Souza de Araújo, et al., 2018).

Catelan *et al.* (2018) demonstrated that the ethanolic extract of the leaves has a high amount of phenolic compounds and an antioxidant effect – in agreement with previous studies. However, these authors suggest a potential risk due to cytotoxic and genotoxic effects observed in a genetic assay using *Allium cepa* L. This was the only toxicity finding identified in this research, therefore, further research on the potential cytotoxic and genotoxic effects is necessary to define a safe threshold of administration.

In contrast, Villas boas *et al.* (Villas Boas, Carvalho dos Santos, et al., 2018; Villas Boas, Souza de Araújo, et al., 2018) showed that *Campomanesia pubescens* fruit extract has a high content of flavonoids (56.84-58.64 mg of quercetin per gram of extract) and via comet assay demonstrated that the extract that the compound has no genotoxic effect on blood cells of animal models, in addition to demonstrating via micronucleus assay that the extract has no clastogenic or aneugenic effects on bone marrow cells when consuming the extract for 28 days (Villas Boas, Souza de Araújo, et al., 2018). The authors highlight a possible dose-dependent threshold of cytoprotective effects and encourage further research into the plant's phytotherapeutic effects. Doses of 2000 mg/kg body weight were considered safe due to the absence of signs of toxicity (Villas Boas, Carvalho dos Santos, et al., 2018).

Exploratory experimental models demonstrate the wide range of possible biological effects of extracts from *Campomanesia pubescens*. Pradella *et al.* (2021), using an animal model of dermal infection, demonstrated that the use of a gel extract of *Campomanesia pubescens* can be effective for both healing and topical/dermal infections. During the experiment, the treatment with *Campomanesia pubescens* was the only one to present complete epithelialization of the wound, evidencing the extract's antimicrobial and topical healing potential (Pradella *et al.*, 2021). Villas boas *et al.* (2020) demonstrated that the administration of an ethanolic extract of *Campomanesia pubescens* for 14 days has antidepressant effects in an animal model. The authors suggest that the effect may be due to the high flavonoid content of *Campomanesia pubescens* extract and its effect on the central nervous system, highlighting the potential of the extract in future developments of plant-based antidepressant agents (German-Ponciano *et al.*, 2018; Khan *et al.*, 2018).

Due to the increase in the consumption of *Campomanesia pubescens*, whether in the form of extracts preparation or use in the food industry, information on chemical characteristics, therapeutic potential and risk of toxicity are relevant information for the economic and therapeutic development of the plant's consumption. This systematic review showed that different extracts from different parts of *Campomanesia pubescens* have a high content of functional compounds with antioxidant, antimicrobial, and anti-inflammatory action without any evidence of toxicity and/or genotoxicity. Studies with *Campomanesia pubescens* still need to be made available. However, this review shows that the different extract types have a high phytomedicinal potential, and further research should be encouraged.

## References

- Alves Junior, A. da S., Melo, E. S. de P., Gondim, J. M. da S., & Nascimento, V. A. do. (2022). Plantas medicinais e fitoterápicos regulamentados no Brasil: risco de toxicidade por metais pesados. *Research, Society and Development*, 11(1), e39111124994.  
<https://doi.org/10.33448/rsd-v11i1.24994>



- Barros, D. B. de, Lima, L. de O. e, Silva, L. A., Fonseca, M. C., Diniz-Neto, H., Rocha, W. P. da S., Beltrão, G. V. de M., Castellano, L. R. C., Guerra, F. Q. S., & Silva, M. V. da. (2022). Efeito antifúngico de  $\alpha$ -pineno isolado e em associação com antifúngicos frente às cepas de *Candida albicans*. *Research, Society and Development*, 11(4), e58711427748.  
<https://doi.org/10.33448/rsd-v11i4.27748>
- Braga, J. C. B., & Silva, L. R. da. (2021). Consumo de plantas medicinais e fitoterápicos no Brasil: perfil de consumidores e sua relação com a pandemia de COVID-19 / Consumption of medicinal plants and herbal medicines in Brazil: consumer profile and its relationship with the COVID-19 pandemic. *Brazilian Journal of Health Review*, 4(1), 3831–3839.  
<https://doi.org/10.34119/bjhrv4n1-303>
- Cardoso, C. A. L., & Ré-Poppi, N. (2009). Identification of the Volatile Compounds of Flower Oil of *Campomanesia pubescens* (Myrtaceae). *Journal of Essential Oil Research*, 21(5), 433–434.  
<https://doi.org/10.1080/10412905.2009.9700210>
- Cardoso, C. A. L., Silva, J. R. M., Kataoka, V. M. F., Brum, C. S., & Poppi, N. R. (2008). Assessment of antioxidant activity, toxicity and chemical composition by GC-MS of the hexane extract from the leaves of *Campomanesia pubescens*. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, 29(n3), 297–301.
- Catelan, T. B. S., Brum, C. C. S., Heredia-Vieira, S. C., Crispim, B. A., Grisolia, A. B., Santos, R. C. S., & Cardoso, C. A. L. (2018). Cytotoxicity, Genotoxicity, Antioxidant Potential and Chemical Composition of Leaves of *Campomanesia pubescens* (Mart. ex DC.) O. Berg. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 19(5), 416–421.  
<https://doi.org/10.2174/1389201019666180626102443>
- Chang, R., Morais, S. A. L., Nascimento, E. A., Cunha, L. C. S., Rocha, E. de O., Aquino, F. J. T., Souza, M. G. M., Cunha, W. R., & Martins, C. H. G. (2011). Essential oil composition and antioxidant and antimicrobial properties of *Campomanesia pubescens* O. Berg, Native of Brazilian Cerrado. *Lat. Am. J. Pharm*, 30(9 LB-chang2011essential), 1843–1848.
- Duarte, W. F., Dias, D. R., de Melo Pereira, G. V., Gervásio, I. M., & Schwan, R. F. (2009).

- Indigenous and inoculated yeast fermentation of gabirola (*Campomanesia pubescens*) pulp for fruit wine production. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 36(4), 557–569.  
<https://doi.org/10.1007/s10295-009-0526-y>
- German-Ponciano, L. J., Rosas-Sánchez, G. U., Rivadeneyra-Domínguez, E., & Rodríguez-Landa, J. F. (2018). Advances in the Preclinical Study of Some Flavonoids as Potential Antidepressant Agents. *Scientifica*, 2018, 1–14. <https://doi.org/10.1155/2018/2963565>
- Guerrero, F. M. G., Zimmerman, L. R., Cardoso, E. V, Lima, C. A. C., Perdomo, R. T., Alva, R., Carollo, C. A., & Guerrero, A. T. (2010). Investigação da toxicidade crônica das folhas de guavira (*Campomanesia pubescens*) em ratos machos. *Revista Fitos*, 5(2 LB-guerrero2010investigacao), 64–72.
- Khan, H., Perviz, S., Sureda, A., Nabavi, S. M., & Tejada, S. (2018). Current standing of plant derived flavonoids as an antidepressant. *Food and Chemical Toxicology*, 119, 176–188.  
<https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.04.052>
- Moher, D., Liberati, A., Tetzlaff, J., & Altman, D. G. (2010). Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: The PRISMA statement. *International Journal of Surgery*, 8(5), 336–341. <https://doi.org/10.1016/j.ijssu.2010.02.007>
- Nagoor Meeran, M. F., Seenipandi, A., Javed, H., Sharma, C., Hashiesh, H. M., Goyal, S. N., Jha, N. K., & Ojha, S. (2021). Can limonene be a possible candidate for evaluation as an agent or adjuvant against infection, immunity, and inflammation in COVID-19? *Heliyon*, 7(1), e05703.  
<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05703>
- Pradella, L. C., Dourado, D. M., Santos, C. H. M. dos, Fermiano, M. H., Matias, R., & Da Silva, B. A. K. (2021). Evaluation of the scientific activity of the leaf of the species *Campomanesia pubescens* in wound model infected by *Staphylococcus aureus*. *Bioscience Journal*, 37, e37032.  
<https://doi.org/10.14393/BJ-v37n0a2021-42182>
- Sharma, S., Gupta, J., Prabhakar, P. K., Gupta, P., Solanki, P., & Rajput, A. (2019). Phytochemical Repurposing of Natural Molecule: Sabinene for Identification of Novel Therapeutic Benefits Using In Silico and In Vitro Approaches. *ASSAY and Drug Development Technologies*, 17(8),

339–351. <https://doi.org/10.1089/adt.2019.939>

Silva, M. G. da, Furtado, M. M., Osório, A. T., Morais, I. C. P. da S., Amaral, M. P. M. do, Coêlho, A. G., & Arcanjo, D. D. R. (2021). A importância dos ensaios de toxicidade para o desenvolvimento e o registro de fitoterápicos no Brasil. *Research, Society and Development*, 10(12), e538101220137. <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i12.20137>

Silva, J. R. M., Cardoso, C. A. L., & Re-Poppi, N. (2009). Essential oil composition of the leaves of *Campomanesia pubescens*. *Chemistry of Natural Compounds*, 45(4), 565–567. <https://doi.org/10.1007/s10600-009-9368-0>

Silva, J. R. M., Ré-Poppi, N., & Cardoso, C. A. L. (2009). Fruit Oil of *Campomanesia pubescens* (Myrtaceae). *Journal of Essential Oil Research*, 21(4), 315–316. <https://doi.org/10.1080/10412905.2009.9700180>

Verma, N., Yadav, A., Bal, S., Gupta, R., & Aggarwal, N. (2019). In Vitro Studies on Ameliorative Effects of Limonene on Cadmium-Induced Genotoxicity in Cultured Human Peripheral Blood Lymphocytes. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 187(4), 1384–1397. <https://doi.org/10.1007/s12010-018-2881-5>

Vieira, A. J., Beserra, F. P., Souza, M. C., Totti, B. M., & Rozza, A. L. (2018). Limonene: Aroma of innovation in health and disease. *Chemico-Biological Interactions*, 283, 97–106. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2018.02.007>

Villas Boas, G. R., Carvalho dos Santos, A., Carvalho Souza, R. I., Souza de Araújo, F. H., Traesel, G. K., Marcelino, J. M., Stefanello da Silveira, A. P., Feitosa Farinelli, B. C., Lima Cardoso, C. A., Boerngen de Lacerda, R., & Oesterreich, S. A. (2018). Preclinical safety evaluation of the ethanolic extract from guavira fruits (*Campomanesia pubescens* (D.C.) O. BERG) in experimental models of acute and short-term toxicity in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 118, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.04.063>

Villas Boas, G. R., Souza de Araújo, F. H., Moreira Marcelino, J., Almeida Castro, L. H., Stefanello da Silveira, A. P., Silva Nacer, R., Rodrigues de Souza, F., Cardoso, C. A. L., Boerngen de Lacerda, R., Guterres, Z. da R., & Oesterreich, S. A. (2018). Preclinical safety evaluation of the

ethanolic extract from *Campomanesia pubescens* (Mart. ex DC.) O. BERG (guavira) fruits: analysis of genotoxicity and clastogenic effects. *Food & Function*, 9(7), 3707–3717.

<https://doi.org/10.1039/C8FO01017J>

Villas Boas, G. R., Stefanello da Silveira, A. P., Feitosa Farinelli, B. C., Lima Cardoso, C. A., Arce, E., & Oesterreich, S. A. (2020). The ethanolic extract obtained from *Campomanesia pubescens* (D.C.) O. BERG fruits exerts anxiolytic and antidepressant effects on chronic mild stress model and on anxiety models in Wistar rats: Behavioral evidences. *Nutritional Neuroscience*, 23(1), 16–26. <https://doi.org/10.1080/1028415X.2018.1466513>

Zamyad, M., Abbasnejad, M., Esmaili-Mahani, S., Mostafavi, A., & Sheibani, V. (2019). The anticonvulsant effects of *Ducrosia anethifolia* (Boiss) essential oil are produced by its main component alpha-pinene in rats. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*, 77(2), 106–114.

<https://doi.org/10.1590/0004-282x20180147>

**Table 1 – Biochemical Characterization from *Campomanesia pubescens* studies.**

| Study                               | Extract                                         | Compounds                                                                                                  |
|-------------------------------------|-------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Silva, Poppi and Cardoso et al. [2] | <i>Leaves essential oil</i>                     | limonene (22.4%), $\alpha$ -pinene (13.3%), sabinene (9.5%), bicyclogermacrene (4.4%), and linalool (3.9%) |
| Catelan et al. [3]                  | <i>Leaves ethanolic extract</i>                 | High phenolic compounds                                                                                    |
| Boas et al. [4]                     | <i>Fruits ethanolic extract</i>                 | High flavonoids compounds                                                                                  |
| Boas et al. [5]                     | <i>Fruits ethanolic extract</i>                 | High flavonoids compounds                                                                                  |
| Silva, Poppi and Cardoso et al. [6] | <i>Oil from fresh fruits</i>                    | cryptomeridiol(14.2%), spathulenol (6.7%), globulol (6.2%), a-cadinol (5.9%) and b-caryophyllene (4.0%).   |
| Cardoso and Poppi [7]               | <i>Flower essential oil</i>                     | ledol (19.8%), globulol (9.2%), a-cadinol (7.3%) and epi-a-muurolol (5.0%).                                |
| Duarte at al. [8]                   | <i>Fruit pulp wine</i>                          | High vitamin C and phenolic compounds                                                                      |
| Chang et al. [9]                    | <i>Root, stem, leaf and fruit essential oil</i> | There are differences in composition in different parts. Total phenolic is higher in Leaves and Fruits.    |
| Boas et al. [10]                    | <i>Fruits ethanolic extract</i>                 | High flavonoids compounds                                                                                  |
| Cardoso et al. [11]                 | <i>Leaves hexane extract</i>                    | Hydrocarbon and oxygenated sesquiterpenes and B-systosterol                                                |

Source: From the author (2023)

**Table 2 – Experimental studies with *Campomanesia pubescens*.**

| Study               | Extract                                  | Experimental Model                                                               | Main conclusion                                                           |
|---------------------|------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|
| Catelan et al. [3]  | Leaves Ethanolic Extract                 | Antioxidant activity (DPPH) Cytotoxicity and genotoxicity ( <i>Allium cepa</i> ) | Moderate antioxidant activity and suggest cytotoxic and genotoxic effects |
| Chang et al. [9]    | Root, stem, leaf and fruit essential oil | Antioxidant activity (DPPH) and antimicrobial activity                           | Higher antioxidant activity and antimicrobial effect.                     |
| Cardoso et al. [11] | <i>Leaves hexane extract</i>             | Antioxidant activity (DPPH and Lipid peroxidation) and toxicity                  | Antioxidant activity and no toxicity                                      |

Source: From the author (2023)

**Table 3 – Experimental studies with *Campomanesia Pubescens* in animal models.**

| Study              | Extract                                | Experimental Model           | Main conclusions                                 |
|--------------------|----------------------------------------|------------------------------|--------------------------------------------------|
| Pradella et al [1] | Leaves Ethanolic Extract (Topical gel) | Wound Infection              | Accelerate healing of topical infection.         |
| Boas et al. [4]    | Fruits Ethanolic Extract               | Comet and Micronucleus assay | No genotoxic and no clastogenic/aneugenic effect |
| Boas et al. [4]    | Fruits Ethanolic Extract               | D. melanogaster SMART test   | No genotoxic effect                              |
| Boas et al. [5]    | Fruits Ethanolic Extract               | Toxicity                     | No toxic effect                                  |
| Boas et al. [10]   | Fruits Ethanolic Extract               | Stress and anxiety           | Antidepressant and anxiolytic effect             |

Source: From the author (2023)

**Artigo 2: Assessment of Preclinical Reproductive Toxicity of  
Ethanolic Extract of *Campomanesia pubescens* (O. Berg) Mattos  
Fruits**



**Submissão:**

**Journal of Ethnopharmacology (Qualis Capes – Medicina II – A1)**

<https://www.sciencedirect.com/journal/journal-of-ethnopharmacology>

Silva, Jacenir Vieira<sup>a\*</sup>;

Burigato, Anahy Arruda<sup>a</sup>;

Mueller, Larissa Pires<sup>a</sup>;

Oesterreich, Silvia Aparecida<sup>a</sup>.

<sup>a</sup> Federal University of Federal da Grande Dourados (UFGD). Faculty of Health Sciences (FCS).



**Assessment of Preclinical Reproductive Toxicity of  
Ethanolic Extract of *Campomanesia pubescens* (Mart.  
Ex DC.) O. Berg Fruits**

**Ethnopharmacological Relevance:** *Campomanesia pubescens* (O. Berg) Mattos is a native Brazilian plant species widely used in food and folk medicine. The influence *Campomanesia pubescens* on the fetus or embryonic development is actually not known. **Aim of the study:** The objective of this study was to evaluate the toxicity profile of the ethanolic extract of *Campomanesia pubescens* fruits in reproductive toxicity model. **Materials and methods:** The ethanolic extract of *Campomanesia pubescens* fruits was obtained from the peeled fruits. This experiment led to segment II of the reproductive toxicity protocol. 88 female Wistar rats were used. The animals were randomization in the following groups: saline negative control (CN), positive control (cyclophosphamide control – CP), 125 mg/kg (CP125), 250 mg/kg (CP250), 500 mg/kg (CP500), 1000 mg/kg (CP1000). Micronucleus and comet assays were performed. **Results:** The animals did not show significant statistical differences in weight, food and water consumption ( $p>0,05$ ). The CP group demonstrated a potential reduction in both the weight of the uterus and the number of implantations during pregnancy. No difference was observed between treated groups in uterus weight, implantations, number of fetuses per pregnancy or average fetuses' weight. **Conclusion:** This study has showed a low level of reproductive toxicity associated with the consumption of the ethanolic extract of *Campomanesia pubescens* fruits. There was no evidence of mutagenic effects.

**Keywords:** Toxicology, fertility, mutagenesis, medicinal plants, Myrtaceae.

## 1. INTRODUCTION

The Brazilian Cerrado is considered a global hotspot for medicinal plants. The local population uses many native plant species for food, prevention, and treatment of various diseases.

*Campomanesia pubescens* (Mart. Ex DC.) O. Berg (Myrtaceae family), popularly known as *guavira*, is a common cerrado plant species with nutritional and pharmacological properties widely used in food and folk medicine (Cardozo et al., 2018).

Medicinal plants often represent the only therapeutic resource in many communities in a country. They have a tradition of use and are capable of preventing, alleviating, or curing illnesses, and their use dates back to the beginnings of humanity until modern times. They are objects of study in several areas, such as phytochemistry, pharmacognosy, and pharmacology. Overall, there is a continuous search for new treatments capable of optimizing standard therapy (Verschaeve and Van Staden, 2008).

Among Brazilian Myrtaceae there are species of medicinal importance whose biological activities include: antioxidant (Brito et al., 2017; Cardoso et al., 2008; Halder et al., 2011; Marin et al., 2008); antimicrobial (Jasmine et al., 2010; Machado et al., 2010); hypoglycemic (Biavatti et al., 2004; Kumar et al., 2010); anti-inflammatory and antinociceptive (Guimarães et al., 2009; Maridass, 2008); immunomodulatory (Carrasco et al., 2010; Guerrero et al., 2010) and hepatoprotective (Sisodia and Bhatnagar, 2009). Studies have shown that the leaves of the species *Campomanesia pubescens* (Mart. Ex DC.) O. Berg (*guavira*), collected in native areas of the cerrado, had an anti-inflammatory effect due to the reduction of circulating monocytes (Guerrero et al., 2010) and an antioxidant effect (Cardoso et al., 2008).

Although centuries of traditional use of medicinal plants by various populations suggest their safety in use, unlike allopathic medicines, the toxicity of traditional herbal medicines has not been fully evaluated in most

cases; therefore, these plants can be highly harmful to human health. For example, some studies have revealed that plants frequently used in folk medicine are potentially genotoxic (Ananthi et al., 2010; Marques, 2003; Melo-Reis et al., 2011; Shin et al., 2011).

Despite the widespread consumption of plants as medicines and foods, the use of these resources often occurs without due scientific proof of their pharmacological properties and toxicological potential.

Interestingly, although most medicinal compounds show very low acute toxicity and/or available safety data, they suggest that the plant does not produce any side effects or toxicity in tested adult experimental animals. However, the influence *Campomanesia pubescens* on fetus or embryonic development is primarily not known. Others traditional medicinal herb showed potential reproductive toxicity (Homady et al., 2002; Khan et al., 2021). Thus, this work aimed to evaluate the toxicity profile of the ethanolic extract of *Campomanesia pubescens* fruits in experimental models of prenatal reproductive toxicity.

## **2. MATERIAL AND METHODS**

### *2.1 Animals and experiment design*

All experiments were carried out in the Animal Facility, the Laboratory of Toxicological Tests (LETOX), and the Laboratory of Surgical Techniques of the Faculty of Health Sciences (FCS) of the Federal University of Grande Dourados (UFGD).

All Wistar rats used in the experiments were provided by the Vivarium of the Federal University of Grande Dourados (UFGD). 123 animals were used (35 males and 88 females) between 8 and 12 weeks of age, (the females must be nulliparous and not pregnant at start point). Females were previously evaluated for heat cycling and those that do not have typical cycles of 4-5 days were not included in the study. The animals were randomized after a period

environment conditioning of 120 hours, during which they were observed daily for general health and adaptation to the vivarium. The animals were kept in polypropylene plastic cages, in a temperature-controlled environment ( $22 \pm 2$  °C), on a 12-hour light/dark cycle and treated with standard chow and water *ad libitum*. The Animal Research Ethics Committee of the Federal University of Grande Dourados approved the experimental protocol via protocol nº 00/2020. The pre-copulation treatment period lasted 14 days, after which individual matrices were formed, each formed by 1 male and 2 females. In order to include 2 estrous cycles, the mating period lasted 10 days during which the vaginal smear technique was carried out daily to determine the frequency of copulation.

The objective was to obtain a greater number of positive pregnancies considered. Day zero of pregnancy was defined as the first positive for the vaginal smear.

On the 11th day, the couples were dismantled, the pregnant females were placed in individual cages for testing of those that obtain a negative pregnancy outcome and normal follow-up for the others. The treatment of males was continued until the recommended total of 28 days, the animals in treatment groups was administered during the period of organogenesis (6th to 15th day of pregnancy).

Following OECD protocol 421, on the 4th day of life, two animals from each offspring (01 male and 01 female, if the number of births allows or otherwise 02 females) were euthanized for testing. Respecting the regulations of the Brazilian College of Animal Experimentation, all euthanasia's in the study was carried out using the inhalational anesthetic isoflurane ( $C_3H_2ClF_5O$ ), proving the death by manually measuring vital signs and analyzing the corneal reflex.

## 2.2 Plant material and obtaining the fruit extract

The collection of fresh fruits of *Campomanesia pubescens* was carried out in their final stage of maturation in different locations in Dourados/MS, Brazil (20 ° 26 ' 34 " S and 54 ° 38 ' 47 " W) that demonstrate a higher incidence of the species, in accordance with the regulations of the Brazilian Environment Agency (registration number 61621-2- MMA / ICMBio / SISBIO) and a sample was deposited at the Federal University of Grande Dourados, in Mato Grosso do Sul, Dourados, MS, Brazil.

The fruits were washed, peeled and crushed (1500.10 g), then macerated with 2 liters of ethanol and left to rest for 7 days. After filtration, the paste resulting from this step was extracted again with 2 liters of ethanol and the union of the liquid fraction obtained after rotavaporation and result in approximately 334.67 g of ethanolic extract of *Campomanesia pubescens* fruits (CP).

## 2.3 Reproductive toxicity experiment

The most commonly used protocols for evaluating the reproductive toxicity of mammals are serialized in three experimental segments that follow the standards set out by the Environmental Protection Agency (EPA), the Food and Drugs Administration (FDA) and the Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). In this study we carried out the Segment I and II of OECD protocol (2018).

- Segment I - Chronic or maternal and paternal fertility toxicity. It aims to evaluate the effects on the fertility of males and females treated before mating. The maximum dose of *Campomanesia pubescens* used was previously determined in a pilot experiment, in which the dosages were established in acute and subacute toxicity research previously developed by the research group in Biology applied to Health/FCS/UFGD in 2017. The recommended protocols used were ANVISA (2013) and OECD (2018).

- Segment II - Prenatal Toxicity: This test method for developmental toxicity testing is designed to provide information on the effects of prenatal exposure on the experimental model and the embryo.

The dose of *Campomanesia pubescens* used was previously determined in a pilot experiment. In the Segment II, a positive control group composed of n=10 females and n=5 males were added, forming 1:2 matrices to validate the mutagenesis and genotoxicity assays. Pregnant females in this positive control group (CP) was treated on the 17th day of pregnancy with cyclophosphamide at a dosage of 50 mg/kg (i.p), in accordance with OECD recommendations (2018). Animals selected for the negative control group (CN) and test group (CP) were treated during the period of organogenesis (6th to 15th day of gestation) (do Carmo et al., 2007). During treatment, females was observed for the presence or absence of signs of toxicity, following Hippocratic screening (do Carmo et al., 2007).

They were monitored daily in relation to body weight, water and feed consumption. At the end of the treatment, to finalize the assessment of maternal toxicity, the blood and organs of the females was collected. The assessment of maternal toxicity is a fundamental point used in conventional developmental toxicity assessment protocols. This evaluation makes it possible to visualize with greater accuracy the effects of the test substance not only on the fetal organism, but also on the female's reproductive physiology, which can lead to toxic effects on the fetus (do Carmo et al., 2007; OECD, 2018).

The pregnancy was terminated by surgical intervention on the 20<sup>th</sup> pregnancy day. At this point, the numbers of corpora lutea, uterine implants, visible reabsorptions, live and dead fetuses and their respective placentas was evaluated. After laparotomy, the fetuses were weighed, analyzed macroscopically and subsequently the Wilson serial section method was used to observe possible anomalies and/or visceral and skeletal malformations of the

progenies (do Carmo et al., 2007).

#### *2.4 Mutagenic assay*

The micronucleus test is a biological assay to detect clastogenic and aneugenic agents. It is one of the most recommended in the field of mutagenicity, being widely accepted by international regulatory agencies, as ANVISA (2013) and OECD (2018).

Test procedures were guided following OECD Guideline 474 (OECD, 2016) and the protocol described by Ribeiro (2003). After euthanasia, the right femur of each animal was removed, and the bone marrow canal was exposed through a cut at the end of the femur. Next, 1 ml of fetal bovine serum was inserted into the medullary canal to remove the cells, and the suspension was centrifuged for 5 minutes at 1000 RPM. The supernatant was removed until 0.5 ml remained in the tube, and the cells were placed on the slide by a single medium compression smear at a 45- degree angle. The slides were dried for 24 hours, fixed with methanol for 5 minutes, stained with pure Giemsa dye for 3 minutes, then with a 1:6 dilution for 15 minutes, passed in running water, and dried again for 24 hours. Finally, they were evaluated under a microscope with a 40x immersion objective. For each animal, 2000 polychromatic erythrocytes were analyzed.

#### *2.5 Hippocratic Screening*

Throughout the entire experiment, all animals were evaluated daily using the Hippocratic screening technique, analyzing the parameters of conscious state (general activity), activity and coordination of the motor system and muscle tone (response to touch, response to tail squeezing, righting, grasping strength and body tone), reflexes (auricular and corneal), activity on the central nervous system (tremors, convulsions, straub tail, anesthesia, ataxia), and

activity on the autonomic nervous system (tearing, cyanosis, ptosis, salivation and piloerection), with a score of 0 for absent, +1 for present with low intensity, +2 for present with moderate intensity, and +3 for present with strong intensity; in addition to daily measurement of body weight, on a digital scale with a capacity of 15 kg, and water and food consumption.

## *2.6 Antioxidant potential*

To analyze the ability to inhibit DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), 3 mL of DPPH 0.1 mM was added at different concentrations of samples in triplicate. Absorbance at 517 nm was determined in a spectrophotometer. The percentage of inhibition was calculated as described by Kumaran and Joel Karunakaran (2006). Linear regression was used to obtain the concentration necessary to inhibit 50% of DPPH, taking into account the 31-fold dilution of the samples when adding the reagent.

ABTS (2,2-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate)) inhibition was determined as described by Rufino et al. (2007). For this, different concentrations of samples were prepared, adding 3 mL of the ABTS•+ reagent and reading at a wavelength of 734 nm after 6 minutes in a dark place. A trolox standard curve was constructed to determine the sample concentration equivalent to the inhibitory capacity of 1000 µM trolox.

The total antioxidant capacity by iron reduction was determined at different concentrations, adding 270 µL of distilled water and 2.7 mL of FRAP reagent in 90 µL of each sample dilution. It was kept for 30 minutes in a water bath (37 °C). Samples were read at a wavelength of 595 nm (Rufino et al., 2006). A standard curve was constructed with ferrous sulfate to determine the sample concentration equivalent to 1000 µM of ferrous sulfate.

## *2.7 Statistical analysis*



Results were expressed as means  $\pm$  standard error for each treatment group. Statistical evaluation was performed using analysis of variance (ANOVA) followed by the Bonferroni test considering the value of  $p < 0.05$  to consider significant differences between the treated and control groups.

### 3. RESULTS

This study showed low reproductive toxicity from ethanolic extract of *Campomanesia pubescens* fruits consumption. During experiment exposition all animals' behavior were monitored, encompassing their overall health and any signs of toxicity. It was conducted as described by Malone and Robichau (1962), revealing no deviations from the baseline.

All animals exhibited activity and responded positively to the stimuli during all experiment periods. Importantly, no fatalities or clinical signs of local or systemic toxic effects were observed throughout the study. Notably, the behavior of all animals across the various tested groups remained within the established norms for their respective species. However, specific data detailing this aspect was not provided in this context. These findings provide evidence for the absence of adverse impacts from *C. Pubescens* extract consumption in hippocratic Screening between groups (data no shown).

The DPPH• assay revealed an inhibitory concentration of  $50.98 \pm 0.07 \mu\text{g mL}^{-1}$ , indicating the ability of the Ethanolic Extract of *Campomanesia pubescens* (Mart. Ex DC.) O. Berg Fruits to neutralize 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radicals. In the ABTS• assay, the extract exhibited antioxidant activity with a Trolox equivalent of  $60.14 \pm 0.04 \mu\text{M}$  per gram, suggesting its capacity to quench 2,2-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate) radicals. The FRAP method demonstrated a total antioxidant capacity of  $32.75 \pm 0.03 \mu\text{M}$  per gram, determined by the reduction of ferric ions, highlighting the extract's ability to act as a reducing agent.

The animals did not show significant statistical differences in weight at end of experiment (figure 1). Unfortunately, it was not possible to equalize the average weight of the groups at the initial point. However, the progression of weight gain was similar in all groups ( $p>0,05$  for groups effect) (figure 1).

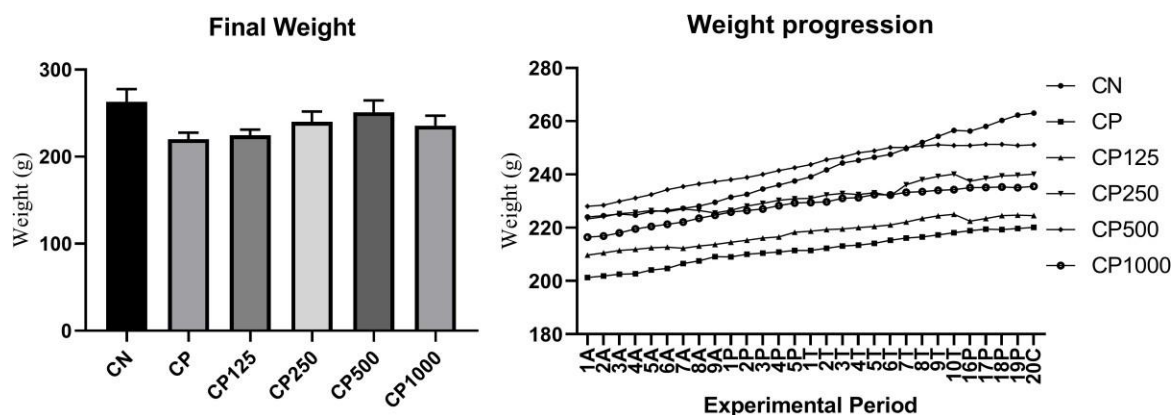


Figure 1 - Mean weight progression and final weight of reproductive toxicity study of *Campomanesia pubescens*. Values expressed as Mean  $\pm$  SEM.

The experimental groups, across all tested doses, exhibited no statistically significant variations in terms of food and water intake in comparison to the control group (figure 2). This suggests that the consumption patterns of food and water and the animals' growth in body weight remained remarkably consistent among all experimental groups and the control group.

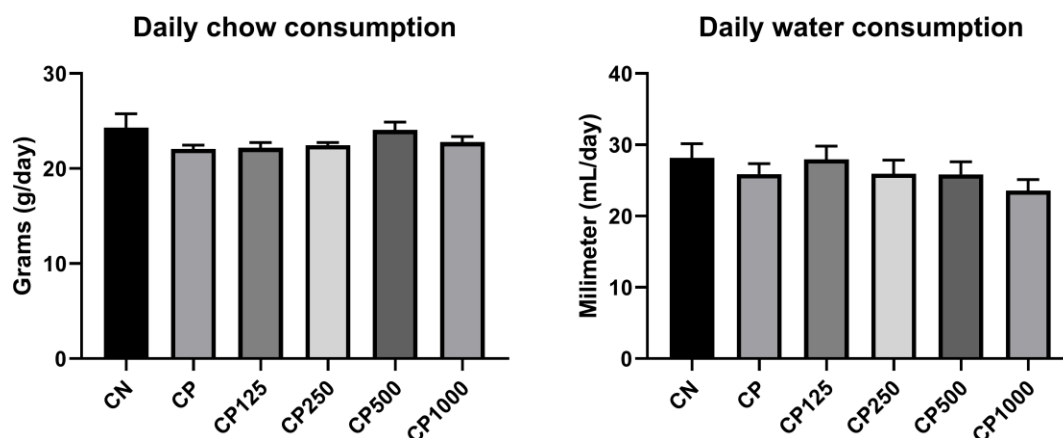


Figure 2 - Chow and water consumption in reproductive toxicity study of *Campomanesia pubescens*. Values expressed as Mean  $\pm$  SEM.

The animals do not show any signal of organ development anomaly (figure 3). Figure 3 provides a comprehensive breakdown of the weight's vital organ in this study animals. It is essential to note that changes in the weight of organs are a recognized indicator of potential toxicity, as indicated by Cunha et al. (2009). In this study, the general data revealed no statistically significant discrepancies in organ weights between tested animals in various dosages and the negative control group. This finding substantiates the hypothesis that the *C. Pubescens* extract may exhibits a low level of toxicity. However, the cyclophosphamide control and the CP1000 groups showed a significantly higher liver weight than negative control group.

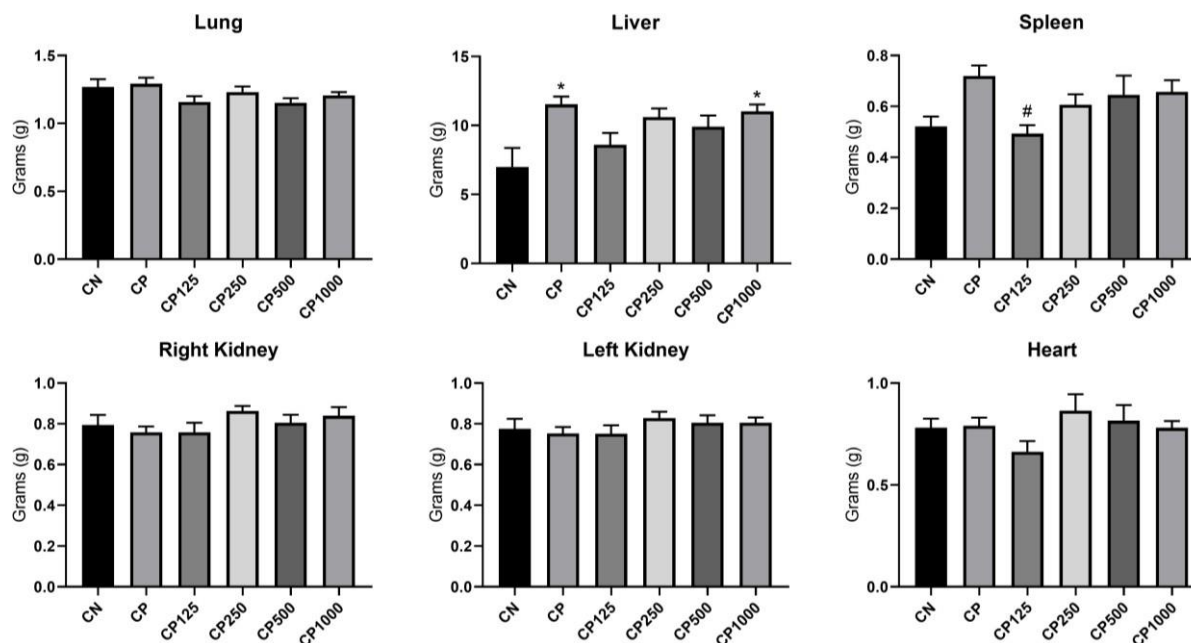


Figure 3 - Organ weights in reproductive toxicity study of *Campomanesia pubescens*. Values expressed as Mean  $\pm$  SEM. (\*) statistically different from CN group; (#) statistically different from CP group.

Figure 4 shows the reproductive organs. Despite the visual difference, the high range of data variability did not allow for a significant difference between the groups. The cyclophosphamide control group (CP) demonstrated a potential reduction in both the weight of the uterus and the number of implantations during pregnancy. However, without significant statistical difference ( $p > 0.05$ ).

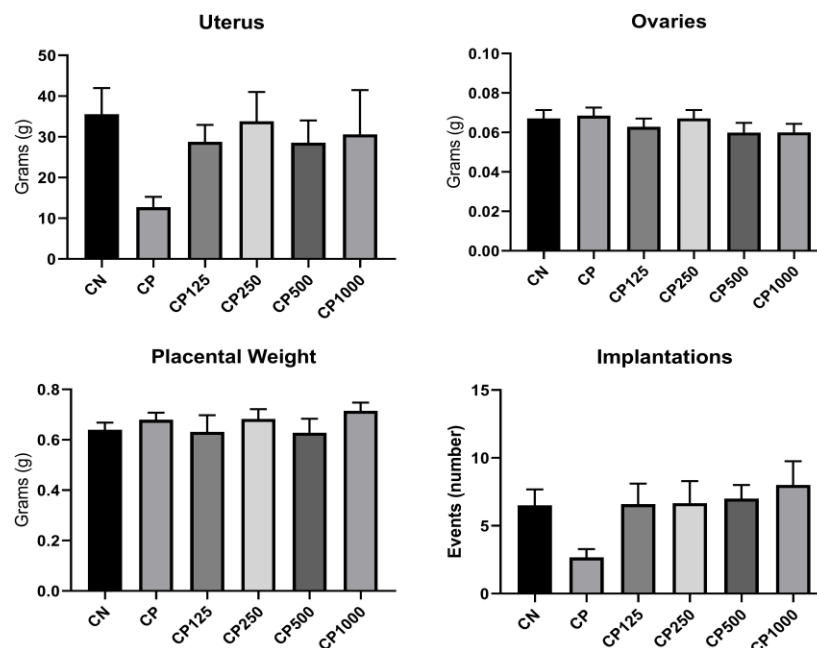


Figure 4 - Reproductive organs weight and reproductive measures of female rats after reproductive toxicity protocol of *Campomanesia pubescens*. Values expressed as Mean  $\pm$  SEM.

(\*) statistically different from CN;

Stillbirth and false pregnancy rates are shown in figure 5. There is no effect pattern attributable to treatment or positive control. The small sample set allows describing the phenomenon of the experiment but prevents a more accurate statistical extrapolation analysis of false pregnancy and stillbirth rates.

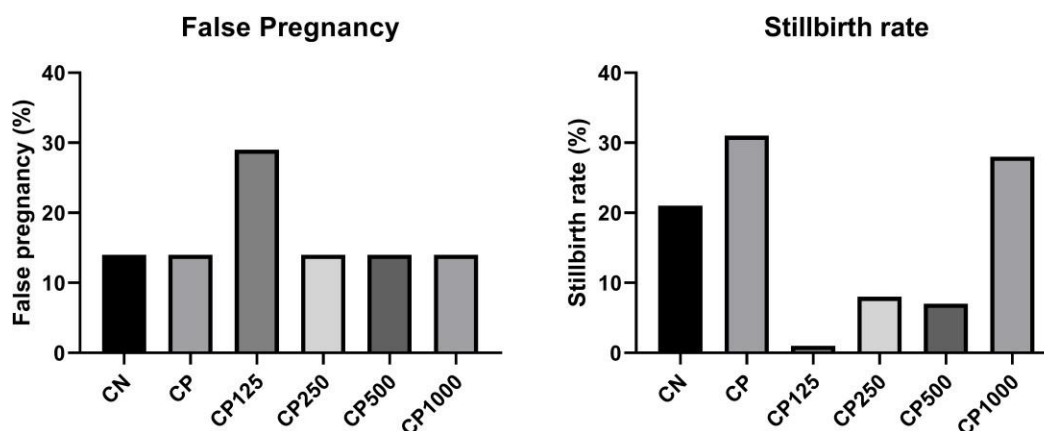


Figure 5 – False pregnancy and Stillbirth rate of animals in reproductive toxicity protocol of *Campomanesia pubescens* Values expressed as %. (\*).

Average number of fetuses per pregnancy and the fetuses mean weight in each group are showed in Figure 6. The positive control group was negatively affected, indicating that the reproductive toxicity model was implemented within the choice of positive control. None of the doses of *C. Pubescens* extract administered in this study showed any change in the number of fetuses per pregnancy or the average weight of the fetuses.

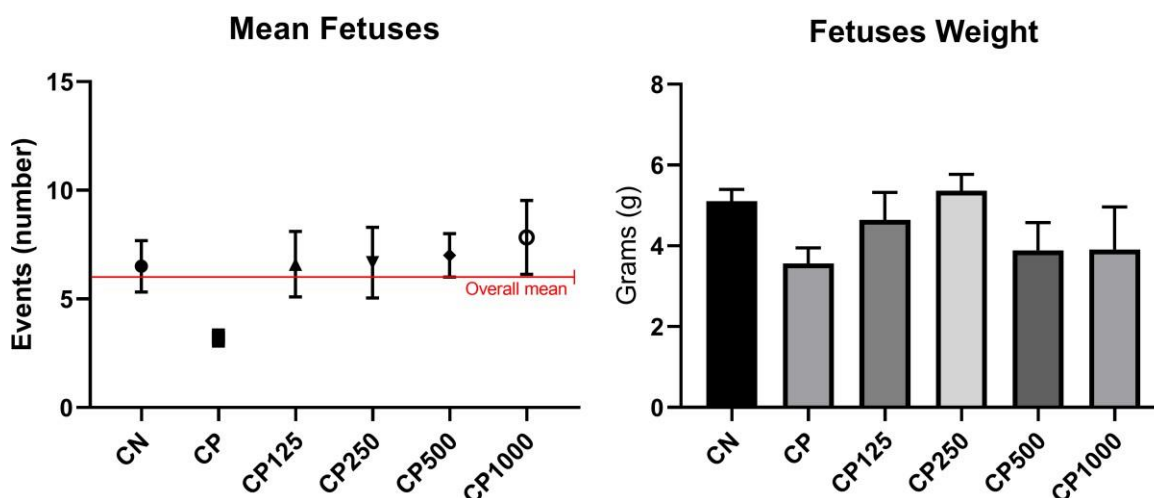


Figure 6 - Number and average weight of fetuses after reproductive toxicity study of *Campomanesia pubescens*.

The mutagen assay was evaluated by micronucleus assay cell count and classification (figure 7). In the micronucleus test, the treatments did not change the PCEs, NCE and PCEMNs in CP treated groups in relation to CN group. However, groups treated with CP had significantly higher PCEMNs and NCE counts than all other experimental groups (figure 7). Positive control presented a significantly higher value than the negative control group and all groups administered with CP, regardless of the dose. The CP500 presented a significantly higher PCE value compared to the CP1000 group only.

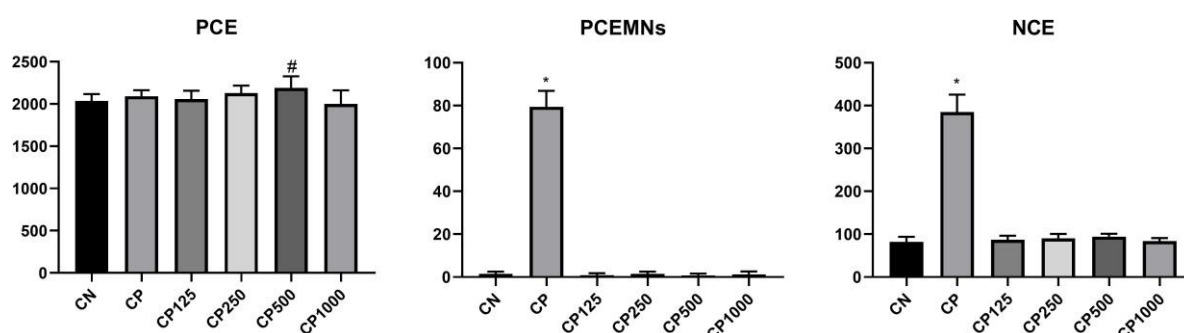


Figure 7 - Micronucleus assay in reproductive toxicity protocol of *Campomanesia pubescens*. Values expressed as Mean  $\pm$  SEM. (\*) statistically different from all other groups; (#) statistically different from CP1000.

#### 4. DISCUSSION

Medicinal plants and their derivatives have gained widespread popularity as an alternative to allopathic drugs globally (Oliveira et al., 2011). While the use of medicinal plants enjoys significant acceptance among the general population, there is a notable scarcity of research and studies that comprehensively assess the toxic pharmacology and potential risks associated with these plants, as pointed out by Almeida et al. (2009). These critical gaps underscore the need for robust toxicological investigations to elucidate the safety profiles of these products and to establish stringent criteria for determining a safe dosage (Farsi et al., 2013). Therefore, despite the myriad virtues associated with medicinal plants, it is

imperative to exercise heightened caution when considering their therapeutic application, as certain plants may harbor the potential for toxicity (Najem et al., 2020).

Medicinal plants can possess toxic properties, and this risk tends to be notably heightened during pregnancy. In cases where poisoning incidents have been reported, the root cause is often attributed to misidentification of plant species or errors in the preparation and administration of remedies. It is strongly recommended that medicinal plants, especially during pregnancy, be scientifically evaluated to ensure the safety of the mother and fetus (Najem et al., 2020; Nasri and Shirzad, 2013).

Interestingly, Aziz and collaborators (2016) surveyed the elemental content of medicinal plants and found that most plants showed elemental contents above the permissible levels recommended by the World health organization (WHO). For example, the concentrations of Cadmium (Cd) and Lead (Pb) were reportedly found higher than the WHO permissible levels in 43 and 42 medicinal plants, respectively. The higher amount of trace and toxic elements in these plants may trigger the accumulation of toxic elements in human bodies, which can cause different types of diseases. Highlighting the indispensability of studies that guarantee reproductive safety for medicinal plants, especially those that already have wide acceptance and popular and/or cultural consumption

This is the first study evaluating reproductive toxicity with fruit extract. Reproductive toxicity encompasses the concept of detrimental interference with the reproductive system and the reproductive capacity of any given species, which includes prenatal development, as guided by Neubert and Chahoud (1995). The objective of the reproductive toxicity test was to assess the *Campomanesia Pubescens* extract's direct impact on the reproductive process within a controlled experimental setting. Given the intricate nature of the mechanisms governing fertility and development, it is conceivable that physiological disruptions resulting from exposure to toxic substances may exert an indirect adverse influence on the reproductive process.

The *Campomanesia pubescens* fruits have a high vitamin C and phenolic



compound content, especially flavanones and chalcones (Cardoso et al., 2010; Duarte et al., 2020, 2009). Furthermore, previously, the ethanolic extract derived from the leaves of *Campomanesia Pubescens* was found to exhibit cytotoxic and genotoxic effects, as evidenced by the *Allium* strain bioassay (Catelan et al., 2018).

This assessment revealed adverse effects in actively dividing cells and an increase in chromosomal alterations. Subsequent *in vivo* studies using the ethanolic extract extracted from the fruits of *Campomanesia Pubescens* under experimental conditions, yielded more reassuring results. Under these studies conditions, both research's did not reveal any substantial genotoxic or clastogenic effects associated with the fruit extract under the conditions evaluated, signifying that the consumption of these fruits can be considered safe (Villas Boas et al., 2018). A study with *Campomanesia pubescens* extract did not show a toxicologic or genotoxic effect in experimental animals (Villas Boas *et al.*, 2018).

This study did not find any signs of reproductive toxicity from the consumption of *Campomanesia pubescens* fruit extract dosage from 125 to 1000 mg/kg. Pregnant animals had the same average weight gain, organ weight, food and water consumption statistical behavior. Signs of reproductive toxicity in females were not observed, the groups treated with *Campomanesia pubescens* had an average weight of the uterus, ovary and placenta similar to the control group (CN), as well as the average amount of implantation per pregnancy. Previous studies have shown that the leaves of the species *Campomanesia pubescens* (Mart. Ex DC.) O. Berg had an antioxidant effect (Cardoso et al., 2008), this study expands the antioxidant effect to the ethanolic extract of the fruits.

The rate of false pregnancy and stillbirth was similar among all groups. Despite the fact that the sample size is limited for inferences of rates of this kind, the absence of an unfavorable statistical slope in the treated groups reinforces an indication of reproductive safety with the consumption of *Campomanesia pubescens*. The consumption of *Campomanesia pubescens* extract did not affect the average number of fetuses per pregnancy or the average weight of the fetuses. The absence of difference with the control group (naïve) indicates a

lack of interference in the reproductive process.

## 5. CONCLUSION

In conclusion, this study has shown a low level of reproductive toxicity associated with consuming the ethanolic extract of *Campomanesia pubescens* fruits. The administration of this extract did not induce any noteworthy physiological or behavioral alterations during pregnancy and exhibited no detrimental effects on the reproductive process. Furthermore, it had no discernible impact on the reproductive organs compared to the control group and did not alter pregnancy outcomes, including fetal quantity and average fetal size. Based on these findings, we can assume that *Campomanesia pubescens*, under these experimental conditions, did not disturb the reproductive function of the rats and did not interrupt the progress of embryo-fetal development, though more extensive, long-term studies are warranted for comprehensive validation.

Further studies in animals and humans are required to investigate if the long-term and/or generational consumption of *Campomanesia pubescens* is equally safe. The data acquired in this study are relevant, as they provide valuable insights into the safe consumption of *Campomanesia pubescens*, a plant species characterized by its substantial economic, nutritional, and ethnopharmacological potential. These findings contribute to our understanding of the potential benefits associated with using *Campomanesia pubescens* and underscore the importance of ensuring its safe utilization, especially in contexts where it plays a vital role in human reproduction.

## 6. ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank CAPES (Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel), CNPq (National Council of Science and Technology) and FUNDECT (Foundation for Supporting the Development of Teaching, Science and Technology of the State of Mato Grosso do Sul) for the scholarships and financial support.

## 7. REFERENCES

- Almeida, A.C., Sobrinho, E.M., Pinho, L. de, Souza, P.N.S., Martins, E.R., Duarte, E.R., Santos, H.O., Brandi, I.V., Cangussu, A.S., Costa, J.P.R., 2009. Toxicidade aguda dos extratos hidroalcoólicos das folhas de alecrim-pimenta, aroeira e barbatimão e do farelo da casca de pequi administrados por via intraperitoneal. *Ciência Rural* 40, 200–203. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782009005000230>.
- Ananthi, R., Chandra, N., Santhiya, S.T., Ramesh, A., 2010. Genotoxic and antigenotoxic effects of *Hemidesmus indicus* R. Br. root extract in cultured lymphocytes. *J. Ethnopharmacol.* 127, 558–560. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2009.10.034>.
- Anvisa, B., 2013. Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos. Anvisa, Brasília. ALP, H 970–975.
- Aziz, M.A., Adnan, M., Begum, S., Azizullah, A., Nazir, R., Iram, S., 2016. A review on the elemental contents of Pakistani medicinal plants: Implications for folk medicines. *J. Ethnopharmacol.* 188, 177–192. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.05.011>
- Biavatti, M., Farias, C., Curtius, F., Brasil, L., Hort, S., Schuster, L., Leite, S., Prado, S.R., 2004. Preliminary studies on *Campomanesia xanthocarpa* (Berg.) and *Cuphea carthagenensis* (Jacq.) J.F. Macbr. aqueous extract: weight control and biochemical parameters. *J. Ethnopharmacol.* 93, 385–389. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2004.04.015>.
- Brito, M.F.M. DE, Marín, E.A., Cruz, D.D. DA, 2017. Medicinal plants in rural settlements of a protected area in the littoral of northeast Brazil. *Ambient. Soc.* 20, 83–104. <https://doi.org/10.1590/1809-4422asoc20150034r2v2012017>.
- Cardoso, C.A.L., Salmazzo, G.R., Honda, N.K., Prates, C.B., Vieira, M. do C., Coelho, R.G., 2010. Antimicrobial Activity of the Extracts and Fractions of Hexanic Fruits of *Campomanesia* Species (Myrtaceae). *J. Med. Food* 13, 1273–1276. <https://doi.org/10.1089/jmf.2009.0047>.
- Cardoso, C.A.L., Silva, J.R.M., Kataoka, V.M.F., Brum, C.S., Poppi, N.R., 2008. Avaliação da atividade antioxidante, toxicidade e composição química por CG-EM do extrato hexânico das folhas de *Campomanesia pubescens*. *Rev. ciências Farm. básica e Apl.* 29.
- Cardozo, C., Inada, A., Marcelino, G., Figueiredo, P., Arakaki, D., Hiane, P., Cardoso, C., Guimarães, R., Freitas, K., 2018. Therapeutic Potential of Brazilian Cerrado *Campomanesia* Species on Metabolic Dysfunctions. *Molecules* 23, 2336. <https://doi.org/10.3390/molecules23092336>.
- Carrasco, F.R., Schmidt, G., Romero, A.L., Sartoretto, J.L., Caparroz-Assef, S.M.,

Bersani-Amado, C.A., Cuman, R.K.N., 2010. Immunomodulatory activity of *Zingiber officinale* Roscoe, *Salvia officinalis* L. and *Syzygium aromaticum* L. essential oils: evidence for humor- and cell- mediated responses. *J. Pharm. Pharmacol.* 61, 961–967. <https://doi.org/10.1211/jpp.61.07.0017>.

Catelan, T.B.S., Brum, C.C.S., Heredia-Vieira, S.C., Crispim, B.A., Grisolia, A.B., Santos, R.C.S., Cardoso, C.A.L., 2018. Cytotoxicity, Genotoxicity, Antioxidant Potential and Chemical Composition of Leaves of *Campomanesia pubescens* (Mart. ex DC.) O. Berg. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 19, 416–421. <https://doi.org/10.2174/1389201019666180626102443>.

do Carmo, J.C., Peter, V.M., de Oliveira Gerra, M., 2007. Cronologia do desenvolvimento embrionário e fetal de ratos conforme a datação do início da prenhez. *Bol. do Cent. Biol. da Reprodução* 26.

Duarte, L.D.S., Pereira, M.T.M., Pascoal, V.D.B., Pascoal, A.C.R.F., 2020. *Campomanesia* genus – a literature review of nonvolatile secondary metabolites, phytochemistry, popular use, biological activities, and toxicology. *Eclética Química J.* 45, 12. <https://doi.org/10.26850/1678-4618eqj.v45.2.2020.p12-22>

Duarte, W.F., Dias, D.R., de Melo Pereira, G.V., Gervásio, I.M., Schwan, R.F., 2009. Indigenous and inoculated yeast fermentation of gabioba (*Campomanesia pubescens*) pulp for fruit wine production. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 36, 557–569. <https://doi.org/10.1007/s10295-009-0526-y>

Farsi, E., Shafaei, A., Hor, S.Y., Khadeer Ahamed, M.B., Yam, M.F., Asmawi, M.Z., Ismail, Z., 2013. Genotoxicity and acute and subchronic toxicity studies of a standardized methanolic extract of *Ficus deltoidea* leaves. *Clinics* 68, 865–875. [https://doi.org/10.6061/clinics/2013\(06\)23](https://doi.org/10.6061/clinics/2013(06)23).

Guerrero, F.M.G., Zimmerman, L.R., Cardoso, E. V, Lima, C.A.C., Perdomo, R.T., Alva, R., Carollo, C.A., Guerrero, A.T., 2010. Investigação da toxicidade crônica das folhas de guavira (*Campomanesia pubescens*) em ratos machos. *Rev. Fitos* 5, 64–72.

Guimarães, A.G., Melo, M.S., Bonfim, R.R., Passos, L.O., Machado, S.M.F., Ribeiro, A. de S., Sobral, M., Thomazzi, S.M., Quintans-Júnior, L.J., 2009. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of the essential oil of *Eugenia candolleana* DC., Myrtaceae, on mice. *Rev. Bras. Farmacogn.* 19, 883–887. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2009000600016>.

Halder, S., Mehta, A., Kar, R., Mustafa, M., Mediratta, P., Sharma, K., 2011. Clove Oil Reverses Learning and Memory Deficits in Scopolamine-Treated Mice. *Planta Med.* 77, 830–834. <https://doi.org/10.1055/s-0030-1250605>.

Homady, M.H., Khleifat, K.M., Tarawneh, K.A., Al-Raheil, I.A., 2002. Reproductive toxicity and infertility effect of *Ferula hormonis* extracts in mice. *Theriogenology* 57, 2247–2256. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(02\)00900-](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)00900-)

7.

Jasmine, R., Selvakumar, B.N., Daisy, P., Ignacimuthu, S., 2010. Activity of *Eugenia jambolana*, an ethnomedical plant, against drug-resistant bacteria. *Pharm. Biol.* 48, 405–410. <https://doi.org/10.3109/13880200903150401>.

Khan, M.F., Alqahtani, A.S., Almarfadi, O.M., Ullah, R., Nasr, F.A., Noman, O.M., Siddiqui, N.A., Shahat, A.A., Ahamad, S.R., 2021. The Reproductive Toxicity Associated with *Dodonaea viscosa*, a Folk Medicinal Plant in Saudi Arabia. Evidence-Based Complement. Altern. Med. 2021, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2021/6689110>.

Kumar, C.H., Kumar, J.N.S., Ishaq, B.M., Rani, G.U., Prkash, K.V., 2010. Antidiabetic activity of a polyherbal preparation. *Pharmacology online* 2, 780–787.

Kumaran, A., Joel karunakaran, R., 2006. Antioxidant and free radical scavenging activity of an aqueous extract of *Coleus aromaticus*. *Food Chem.* 97, 109–114. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.03.032>.

Machado, M., Sousa, M. do C., Salgueiro, L., Cavaleiro, C., 2010. Effects of Essential Oils on the Growth of *Giardia lamblia* Trophozoites. *Nat. Prod. Commun.* 5, 1934578X1000500. <https://doi.org/10.1177/1934578X1000500132>.

Maridass, M., 2008. Composition and anti-inflammatory activity of the essential oil of *Eugenia discifera* (Myrtaceae). *Int. J. Essent. Oil Ther.* 2, 163–166.

Marin, R., Apel, M.A., Limberger, R.P., Raseira, M.C.B., Pereira, J.F.M., Zuanazzi, J.A.S., Henriques, A.T., 2008. Volatile components and antioxidant activity from some Myrtaceous fruits cultivated in Southern Brazil. *Lat. Am. J. Pharm.* 27, 172.

Marques, R., 2003. Evaluation of the mutagenic potential of yangambin and of the hydroalcoholic extract of *Ocotea duckei* by the Ames test. *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.* 536, 117–120. [https://doi.org/10.1016/S1383-5718\(03\)00040-8](https://doi.org/10.1016/S1383-5718(03)00040-8).

Melo-Reis, P., Bezerra, L., Vale, M., Canhête, R., Chen-Chen, L., 2011. Assessment of the mutagenic and antimutagenic activity of *Synadenium umbellatum* Pax latex by micronucleus test in mice. *Brazilian J. Biol.* 71, 169–174. <https://doi.org/10.1590/S1519-69842011000100024>

Najem, M., Harouak, H., Ibijbijen, J., Nassiri, L., 2020. Oral disorders and ethnobotanical treatments: A field study in the central Middle Atlas (Morocco). *Heliyon* 6, e04707. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04707>.

Nasri, H.R., Shirzad, H., 2013. Toxicity and safety of medicinal plants. *J. HerbMed Pharmacol.* 2, 21–22.

Neubert, D., Chahoud, I., 1995. Possible consequences of pre-or early postnatal

exposure to substances with estrogenic or androgenic properties. *Endocr Chem Env.* 3, 24–52.

OECD, O. for E.C. and D., 2018. Test No. 414: Prenatal developmental toxicity study. OECD Publishing.

OECD, O. for economic cooperation and development, 2016. Test No. 474: Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. OECD. <https://doi.org/10.1787/9789264264762-en>.

Oliveira, A., Oliveira, N., Resende, U., Martins, P., 2011. Ethnobotany and traditional medicine of the inhabitants of the Pantanal Negro sub-region and the raizeiros of Miranda and Aquidauna, Mato Grosso do Sul, Brazil. *Brazilian J. Biol.* 71, 283–289. <https://doi.org/10.1590/S1519-69842011000200007>.

Ribeiro, L.R., Marques, E.K., Salvadori, D.M.F., 2003. *Mutagênese ambiental*. Editora da ULBRA. Rufino, M., Alves, R.E., de Brito, E.S., de Moraes, S.M., Sampaio, C. de G., Pérez-Jimenez, J., Saura-Calixto, F.D., 2007. Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH.

Rufino, M., ALVES, R.E., De Brito, E.S., De Moraes, S.M., Sampaio, C. de G., PÉREZ-JIMÉNEZ, J., SAURA-CALIXTO, F.D., 2006. Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pelo método de redução do ferro (FRAP).

Shin, I.S., Seo, C.S., Ha, H.K., Lee, M.Y., Huang, D.S., Huh, J.I., Shin, H.-K., 2011. Genotoxicity assessment of Pyungwi-san (PWS), a traditional herbal prescription. *J. Ethnopharmacol.* 133, 696–703. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.10.050>.

Sisodia, S., Bhatnagar, M., 2009. Hepatoprotective activity of *Eugenia jambolana* Lam. in carbon tetrachloride treated rats. *Indian J. Pharmacol.* 41, 23. <https://doi.org/10.4103/0253-7613.48888>.

Verschaeve, L., Van Staden, J., 2008. Mutagenic and antimutagenic properties of extracts from South African traditional medicinal plants. *J. Ethnopharmacol.* 119, 575–587. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2008.06.007>.

Villas Boas, G.R., Carvalho dos Santos, A., Carvalho Souza, R.I., Souza de Araújo, F.H., Traesel, G.K., Marcelino, J.M., Stefanello da Silveira, A.P., Feitosa Farinelli, B.C., Lima Cardoso, C.A., Boerngen de Lacerda, R., Oesterreich, S.A., 2018. Preclinical safety evaluation of the ethanolic extract from guavira fruits (*Campomanesia pubescens* (D.C.) O. BERG) in experimental models of acute and short-term toxicity in rats. *Food Chem. Toxicol.* 118, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.04.063>.

## 6. CONCLUSÕES

Neste estudo ficou evidente através da revisão sistemática que diferentes tipos de extrato de *Campomanesia pubescens* apresentaram alto teor de compostos fenólicos lhe conferindo um potencial antioxidante a qual é um fator protetor para a gestação, bem como não apresentaram, nestes estudos, evidências de toxicidade e/ou mutagenicidade.

Na avaliação experimental com extrato etanólico dos frutos de *Campomanesia pubescens*, conclui-se que: o uso do extrato não induziu quaisquer alterações fisiológicas ou comportamentais durante a gravidez e efeitos prejudiciais no processo reprodutivo, não gerando alterações nos órgãos reprodutivos, nem nos pesos e quantidade de fetos, bem como não apresentou efeitos mutagênicos. Apresentou efeito antioxidante significativo nos ensaios DPPH, ABTS e FRAP, corroborando com a literatura.

Com base nestes resultados, podemos inferir que *Campomanesia pubescens*, nestas condições experimentais, não perturbou a função reprodutiva dos ratos não interferindo no desenvolvimento gestacional, embora estudos mais extensos e de longo prazo sejam necessários para uma validação mais abrangente e segura, sendo esses dados relevantes, pois fornecem informações valiosas sobre o consumo seguro de *Campomanesia pubescens*, uma espécie vegetal caracterizada pelo seu substancial potencial econômico, nutricional e etnofarmacológico.

Tais constatações contribuem para a compreensão dos benefícios associados à utilização de *Campomanesia pubescens* e sublinham a importância de garantir a sua utilização segura e eficaz.

## 7. MATERIAL COMPLEMENTAR

**Tabela Ciclo estral (Ratas Wistar)**

| Ciclo Estral              |                                                                                       |                                                                                                                  |                                                                                            |                                                                                                         |
|---------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Metaestro                 | Diestro                                                                               | Proestro                                                                                                         | Estro                                                                                      |                                                                                                         |
| Fase                      | Transitória                                                                           | Pré-ovulatória                                                                                                   | Ovulatória                                                                                 | Pós-ovulatória                                                                                          |
| Duração                   | 21h                                                                                   | 57h                                                                                                              | 12h                                                                                        | 14h                                                                                                     |
| Característica hormonal   | Fase não fértil do ciclo. O estradiol, o FSH, a progesterona e o LH estão diminuídos. | Fase não fértil do ciclo. O estradiol, o FSH e o LH estão diminuídos. Oscilação de concentração de progesterona. | O LH, a prolactina e o FSH estão elevados. Aumento dos estrógenos, culminando na ovulação. | A fêmea está sexualmente receptiva ao macho. Altos níveis estrogênicos e baixos níveis de progesterona. |
| Característica citológica | Presença de leucócitos, muco e resíduos de células queratinizadas.                    | Prevalência de leucócitos e presença de algumas células nucleadas.                                               | Predomínio de células epiteliais nucleadas. Ausência total de leucócitos.                  | Predomínio de células queratinizadas. Ausência total de leucócitos                                      |

*Adaptado de LAPCHIK, MATTARAIA e KO (2009) e TRAESEL (2017).*

**Imagem 3.** Extrato-etanólico-Campomanesia pubescens



*Fonte: autor (2023)*



**Imagem 4.** Presença de espermatozóides em lavado vaginal durante processo de acasalamento pelo método de Poley.



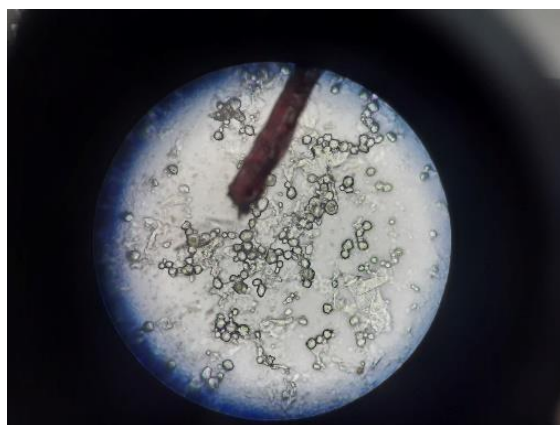
Fonte: autor (2023)

**Imagem 5.** Ciclo estral Diestro detectado em lavado vaginal durante processo de acasalamento.



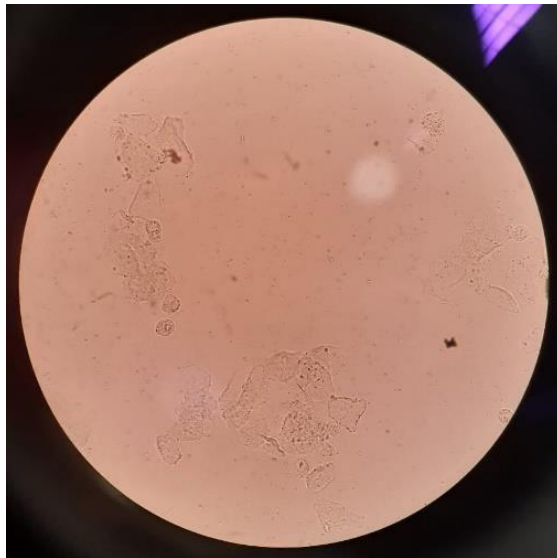
Fonte: autor (2023).

**Imagem 6.** Ciclo estral Metaestro detectado em lavado vaginal durante processo de acasalamento



Fonte: autor (2023).

**Imagem 7.** Ciclo estral Estro detectado em lavado vaginal durante processo de acasalamento



**Imagem 8.** Ciclo estral Proestro detectado em lavado vaginal durante processo de acasalamento.



*Fonte: autor (2023).*

**Imagem 9.** Laparotomia exploratória-cesariana grupo tratamento dose 125 mg/KG Extrato etanólico de *C. Pubescens*.



Fonte: autor (2023).

**Imagem 10.** Feto e placenta grupo tratamento dose 125 mg/KG Extrato etanólico de *C. Pubescens*.



Fonte: autor (2023).

**Imagem 11-** Fetos e placentas placenta grupo tratamento dose 250 mg/KG Extrato etanólico de *C. Pubescens*.



Fonte: autor (2023).

**Imagem 12.** Implantações uterinas grupo tratamento dose 250 mg/KG Extrato etanólico de *C. Pubescens*.



Fonte: autor (2023).



**Imagem 13** . Feto após diafanização com vermelho de alizarina, para análise esquelética



*Fonte: autor (2023).*

## 8. PARTICIPAÇÃO EM TRABALHOS DO GRUPO DE PESQUISA:

- ✓ Artigo submetido: Journal of Ethnopharmacology (Qualis Capes – Medicina II – A1)  
***Campomanesia sessiliflora* (O.Berg) mattos: A literature review.**  
Autores: Anahy Arruda Burigato, Jacenir Vieira da Silva, Larissa Pires Mueller e Silvia Aparecida Oesterreich
  
- ✓ Artigo submetido: Bioscience Journal (Qualis Capes-Medicina II-B3)  
**Study of the acute, subacute, genotoxic, and mutagenic toxicity of the lyophilized extract of the leaves of *Campomanesia sessiliflora* (O. Berg) Mattos in Wistar rats**  
Autores: Anahy Arruda Burigato, Jacenir Vieira da Silva, Larissa Pires Mueller, Flávio Henrique Souza de Araújo, Cláudia Andréa Lima Cardoso, Roosevelt Isaías Carvalho Souza, Agruslândia Rezende de Souza, Felipe Francisco Bittencourt Junior e Silvia Aparecida Oesterreich.
  
- ✓ Artigo submetido revista: SCIENTIA PLENA (Qualis Capes – Medicina II – A4)  
**Cytotoxic Action of the Lyophilized Infusion of *Aristolochia triangularis* Leaves on *Saccharomyces cerevisiae***  
Autores: Larissa Pires Mueller, Anahy Arruda Burigato, Jacenir Vieira da Silva, Débora Tavares Sarabia, Laís Chancare Garcia, Maria do Socorro Mascarenhas, Ângelo Rodolfo Santiago, Lavinia Almeida Muller, Débora Regina Hoff Brait, Ramão Souza de Deus Júnior, Margareth Batistote e Silvia Aparecida Oesterreich.
  
- ✓ Autor capítulo de livro:  
**Capítulo 10: CAENORHABDITIS ELEGANS, GALLERIA MELLONELLA E DROSOPHILA MELANOGASTER COMO MODELOS ALTERNATIVOS PARA PESQUISA IN VIVO DE PLANTAS MEDICINAIS**  
Autores: Raquel Borges de Barros Primo, Jacenir Vieira da Silva, Larissa P. Mueller, Flávio H. S. Araújo e Silvia Aparecida Oesterreich.  
Livro: **Produtos Naturais e suas aplicações: da comunidade para o laboratório.**  
Editora científica digital, 2021, Guarujá-SP. Organizador: Silvio de Almeida Júnior.

## 9. CARTA DE APROVAÇÃO CEUA - COMISSÃO 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, 27 de Junho de 2019.

#### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada **“Avaliação da toxicidade reprodutiva pré-clínica do extrato etanólico dos frutos da guavira (*Campomanesia pubescens*)”**, registrada sob o protocolo de nº 04/2019, sob a responsabilidade de *Silvia Aparecida Oesterreich e Flávio Henrique Souza de Araújo* – 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 29/03/2019.

|                                |                                             |
|--------------------------------|---------------------------------------------|
| <i>Finalidade</i>              | <i>( ) Ensino ( X ) Pesquisa Científica</i> |
| <i>Vigência da autorização</i> | <i>01/09/2019 a 01/03/2021</i>              |
| <i>Espécie/linhagem/raça</i>   | <i>Rattus norvegicus – Wistar</i>           |
| <i>Nº de animais</i>           | <i>147</i>                                  |
| <i>Peso/idade</i>              | <i>110 g / 8 – 12 semanas</i>               |
| <i>Sexo</i>                    | <i>43 Machos e 104 Fêmeas</i>               |
| <i>Origem</i>                  | <i>Biotério Central UFGD</i>                |

Melissa Negrão Sepulveda Coordenadora CEUA

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UFGD – Rua João Rosa Góes, 1761 – Vila Progresso.  
Dourados/MS. E-mail: ceua@ufgd.edu.br

## **10. DOCUMENTOS ADICIONAIS DE CO-AUTORIA**





Jacenir Vieira da Silva &lt;jacenirsilva@ufgd.edu.br&gt;

---

**[Pharmaceutics] Manuscript ID: pharmaceutics-3022624; doi: 10.3390/pharmaceutics16070842. Paper has been published.**

1 mensagem

---

**pharmaceutics@mdpi.com** <pharmaceutics@mdpi.com>

21 de junho de 2024 às 05:42

Responder a: yoonaxu@mdpi.com, pharmaceutics@mdpi.com

Para: mariamedinaazevedo@outlook.com, francislaine@ufpr.br, silvia.burger@edu.unipar.br, jacenirsilva@ufgd.edu.br, danielleayr@gmail.com, marco.martines@ufms.br, lafourcade.ariadna@ufms.br, jesussamado@ufgd.edu.br, arquimedesjunior@ufgd.edu.br

Cc: billing@mdpi.com, website@mdpi.com, pharmaceutics@mdpi.com, veronica.zhong@mdpi.com, wan.li@mdpi.com, yoonaxu@mdpi.com

Dear Authors,

We are pleased to inform you that your article "NO-cGMP-K<sup>+</sup> Channels Pathways Participate in the Antihypertensive Effects of *Attalea phalerata* Martius ex Spreng Oil-Loaded Nanocapsules" has been published in *Pharmaceutics* as part of the Special Issue Targeted Drug Delivery System for Cardiovascular Diseases Treatment and is available online:

Website: <https://www.mdpi.com/1999-4923/16/7/842>PDF Version: <https://www.mdpi.com/1999-4923/16/7/842/pdf>

The meta data of your article, the manuscript files and a publication certificate are available here (only available to corresponding authors after login):

[https://susy.mdpi.com/user/manuscripts/review\\_info/a7c2442892de583a681e50d1777e8590](https://susy.mdpi.com/user/manuscripts/review_info/a7c2442892de583a681e50d1777e8590) Special Issue:[https://www.mdpi.com/journal/pharmaceutics/special\\_issues/VB66TWT112](https://www.mdpi.com/journal/pharmaceutics/special_issues/VB66TWT112)

Please take a moment to check that everything is correct. You can reply to this email if there is a problem. If any errors are noticed, please note that all authors must follow MDPI's policy on updating published papers, found here: <https://www.mdpi.com/ethics#16>.

To encourage open scientific discussions and increase the visibility of published articles, MDPI recently implemented interactive commenting and recommendation functionalities on all article webpages (side bar on the right). We encourage you to forward the article link to your colleagues and peers.

We encourage you to set up your profile at [www.SciProfiles.com](http://www.SciProfiles.com), MDPI's researcher network platform. Articles you publish with MDPI will be linked to your SciProfiles page, where colleagues and peers will be able to see all of your publications, citations, as well as your other academic contributions. Please also feel free to send us feedback on the platform that we can improve it quickly and make it useful for scientific communities.

You can also share the paper on various social networks by clicking the links on the article webpage. Alternatively, our Editorial Office can post an announcement of your article on our Twitter channel, please send us a text of up to 200 characters with spaces. Please note that our service Scitations.net will automatically notify authors cited in your article. For further paper promotion guidelines, please refer to the following link: <https://www.mdpi.com/authors/promoting>.

We would be happy to keep you updated about new issue releases of *pharmaceutics*. Please enter your e-mail address in the box at <https://www.mdpi.com/journal/pharmaceutics/toc-alert/> to receive notifications. After issue release, a version of your paper including the issue cover will be available to download from the article abstract page.

To order high quality reprints of your article in quantities of 25-1000, visit: <https://www.mdpi.com/1999-4923/16/7/842/reprints>

We support the multidisciplinary preprint platform /Preprints/, which permanently archives full text documents and datasets of working papers in all subject areas. Posting on the platform is entirely free of charge, and full details can be viewed at <http://www.preprints.org>.

To help us improve our Production and English editing service, provided as part of MDPI's editorial process, please take a few minutes to participate in the following survey: <https://www.surveymonkey.com/r/BNMJJB> (for Production and English editing service).

Thank you for choosing Pharmaceutics to publish your work, we look forward to receiving further contributions from your research group in the future.

Kind regards,

-- MDPI  
Postfach, CH - 4020 Basel, Switzerland  
Office: St. Alban-Anlage 66, 4052 Basel, Switzerland Tel. +41  
61 683 77 34  
Fax: +41 61 302 89 18  
E-mail: [website@mdpi.com](mailto:website@mdpi.com) <https://www.mdpi.com/>

## Article

# NO-cGMP-K<sup>+</sup> Channels Pathways Participate in the Antihypertensive Effects of *Attalea phalerata* Mart. ex Spreng. Oil-Loaded Nanocapsules

Maria Medina de Azevedo <sup>1</sup>, Francislaine Aparecida dos Reis Lívero <sup>2</sup>, Sílvia Beatriz Bürger Tinelli <sup>3</sup>, Jacenir Vieira da Silva <sup>1</sup>, Danielle Ayr Tavares de Almeida <sup>1</sup>, Marco Antonio Utrera Martines <sup>4</sup>, Ariadna Lafourcade Prada <sup>5</sup>, Jesús Rafael Rodríguez Amado <sup>1</sup>, Arquimedes Gasparotto Junior <sup>1,\*</sup>

- <sup>1</sup> Laboratory of Cardiovascular Pharmacology (LaFaC), Faculty of Health Sciences, Federal University of Grande Dourados (UFGD), Dourados 79804-970, MS, Brazil; mariamedinaazevedo@outlook.com (M.M.d.A.); jacenirsilva@ufgd.edu.br (J.V.d.S.); danielleayr@gmail.com (D.A.T.d.A.); jesusamado@ufgd.edu.br (J.R.R.A.)
- <sup>2</sup> Laboratory of Cardiometaabolic Pharmacology, Department of Pharmacology, Federal University of Parana (UFPR), Curitiba 80060-000, PR, Brazil; francislaine@ufpr.br
- <sup>3</sup> Postgraduate Program in Biotechnology Applied to Agriculture, Paranaense University, Umuarama 87502-210, PR, Brazil; silvia.burger@edu.unipar.br
- <sup>4</sup> Laboratory of Nanostructured Materials, Metallodrugs and Medicines, Institute of Chemistry, Federal de University of Mato Grosso do Sul, Campo Grande 79070-900, MS, Brazil; marco.martines@ufms.br
- <sup>5</sup> Postgraduate Program in Biotechnology, Faculty of Pharmacy, Food, and Nutrition, Federal University of Mato Grosso do Sul, Campo Grande 79070-900, MS, Brazil; lafourcade.ariadna@ufms.br
- \* Correspondence: arquimedesgasparotto@gmail.com or arquimedesjunior@ufgd.edu.br

**Citation:** de Azevedo, M.M.; Lívero, F.A.D.R.; Tinelli, S.B.B.; da Silva, J.V.; de Almeida, D.A.T.; Martines, M.A.U.; Prada, A.L.; Rodrigues Amado, J.R.; Gasparotto Junior, A. NO-cGMP-K<sup>+</sup> Channels Pathways Participate in the Antihypertensive Effects of *Attalea phalerata* Mart. ex Spreng. Oil-Loaded Nanocapsules. *Pharmaceutics* **2024**, *16*, x. <https://doi.org/10.3390/xxxxx>

Academic Editor: Yasumasa Ikeda

Received: 10 May 2024

Revised: 14 June 2024

Accepted: 18 June 2024

Published: date



**Copyright:** © 2024 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** *Attalea phalerata* Mart. ex Spreng. is a palm tree that is widely distributed in the Central-West region of Brazil. In this study, we investigated whether the oil-loaded nanocapsules of *A. phalerata* (APON) have acute and long-lasting antihypertensive effects in male spontaneously hypertensive rats (SHR), as well as explored the underlying molecular mechanisms. APON was prepared using the interfacial polymer deposition method. The particle size, polydispersity index, and zeta potential were investigated using dynamic and electrophoretic light scattering. The antihypertensive effects of APON (administered at doses of 1, 3, and 10 mg/kg) were evaluated after acute intraduodenal administration and after 7 days of oral treatment. To investigate the molecular pathways involved, we used pharmacological antagonists and inhibitors that target prostaglandin/cyclic adenosine monophosphate, nitric oxide/cyclic guanosine monophosphate, and potassium channels. Both acute and prolonged administration of APON (at doses of 3 and 10 mg/kg) resulted in a significant reduction in systolic, diastolic, and mean arterial pressure. Prior treatment with a non-selective nitric oxide synthase inhibitor (N<sup>ω</sup>-nitro-L-arginine methyl ester), guanylyl cyclase inhibitor (methylene blue), or non-selective calcium-sensitive K<sup>+</sup> channel blocker (tetraethylammonium) abolished the antihypertensive effects of APON. Our study showed that *A. phalerata* oil-loaded nanocapsules have a significant antihypertensive effect in SHR after both short-term and long-term (7-day) use. This effect seems to rely on the vascular endothelium function and involves the NO-cGMP-K<sup>+</sup> channel pathway. This research suggests a new direction for future studies to definitively prove the therapeutic benefits of APON in treating cardiovascular disease.

**Keywords:** Arecaceae; acuri; cardiovascular; drug carrier; hypertension; nanoformulation

## 1. Introduction

Cardiovascular disease (CVD) remains a global health challenge, significantly contributing to mortality and morbidity rates worldwide. Hypertension, a prevalent CVD, significantly increases the risk of heart failure, coronary artery disease, and chronic kidney disease [1,2]. Traditional populations have a longstanding practice of using medicinal plants and herbs in the management of cardiovascular ailments, particularly hypertension. These natural products contain a rich source of biologically active compounds, favoring the development of new herbal medicines [3,4]. Despite the rich phytochemical spectrum, many plant-based preparations have low solubility and gastrointestinal absorption [5]. Therefore, the use of nanocarriers can promote the development of innovative formulations from natural products, becoming effective pharmaceutical forms for the treatment of cardiovascular diseases [6].

Palm tree oils are commonly used as food and remedies by traditional communities [6]. The palm tree oil (dendé oil) obtained from the *Elaeis guineensis* and Coconut oil (from *Cocos nucifera*) are the palm tree oils most known and commercialized around the world. However, there is a diversity of oils produced by different species of the Arecaceae family which are little known but widely used by native populations both as food and as remedy. *Attalea phalerata* Mart. ex Spreng., commonly known as acurí, is a palm tree native to Central-West Brazil, and particularly, to the Cerrado biome [7,8]. Traditionally, indigenous populations have used the kernel oil of *A. phalerata* as a substitute for palm and coconut oil in cooking [6,7]. Additionally, acurí oil has been used in traditional medicine to treat fever, skin lesions, respiratory problems, and inflammation [7,9].

Recent research suggests potential health benefits beyond its traditional uses. Acácio et al. [7] reported that APO contains 79.60% saturated fatty acids ( $C_{8:0}$ , 8.73%;  $C_{10:0}$ , 7.91%;  $C_{12:0}$ , 43.33%;  $C_{14:0}$ , 10.80%;  $C_{16:0}$ , 6.69%;  $C_{18:0}$ , 2.20%) and 20.35% unsaturated fatty acids ( $C_{18:1n9c}$ , 18.01% and  $C_{18:2n6c}$ , 2.35%). Dodecanoic acid ( $C_{12:0}$ ), also known as lauric acid is the prevalent saturated fatty acid present in APO. It has diverse beneficial effects, including cholesterol reduction [8]. The prevalent unsaturated fatty acid contained in APO is 9-octadecenoic acid ( $C_{18:1n9c}$ , also known as oleic acid). Oleic acid reduces total cholesterol and low-density lipoprotein cholesterol, and contributes to regulating the blood pressure. However, APO was never evaluated in order to validate its utility in those health conditions.

Our research group has developed a formulation called acurí oil-loaded nanocapsules (APON) that demonstrates anti-inflammatory and cytotoxic effects against cancer cells [8]. APON reduces serum triglycerides and total cholesterol in rats, suggesting potential applications in preventing and treating cardiovascular diseases [8]. Additionally, the study found APON to be non-toxic at high doses in rats, with an  $LD_{50}$  exceeding 2000 mg/kg [9].

This study investigated the effects of *Attalea phalerata* Mart. ex Spreng. oil-loaded nanocapsules (APON) on blood pressure in male spontaneously hypertensive rats (SHR). We specifically assessed whether APON administration resulted in acute and/or long-term anti-hypertensive effects. Additionally, we explored the underlying molecular mechanisms responsible for the observed hemodynamic changes.

## 2. Results

### 2.1. Oil extraction and Characterization

The *Athalea phalerata* oil (APO) is non-viscous and translucent liquid, yellowish, with the aroma of the ripe fruit. The extraction yielded 35.25% (*w:w*) of APO. APO exhibited a refractive index (at 30 °C) of  $1.4590 \pm 0.0105$ , a density (30 °C) of  $0.925 \pm 0.040$ , an acidity value of  $0.12 \pm 0.02\%$ , an iodine value of  $21.50 \pm 3.15$ , and a saponification value of  $237.80 \pm 10.25$ .

## 2.2. Fatty Acid Profile

The fatty acid composition of the APO is shown in Table 1. It is important to note that the lipid composition of Acurí oil includes just eight fatty acids, with saturated fatty acids making up 79.60% and the predominant compound being dodecanoic acid. Unsaturated fatty acids make up 20.35%, with the prevalent one being octadecenoic acid.

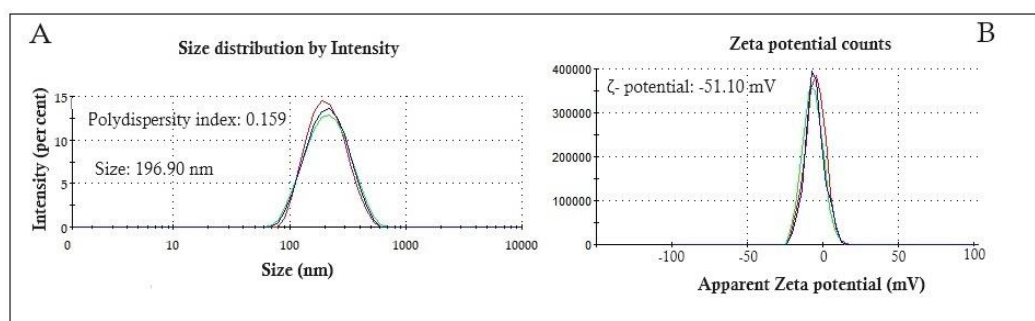
**Table 1.** Fatty acid profile of the Acurí kernel oil.

| Chain Length         | Fatty Acid                | Relative Quantity (%) |
|----------------------|---------------------------|-----------------------|
| C <sub>8:0</sub>     | Octanoic acid             | 8.91 ± 0.31           |
| C <sub>10:0</sub>    | Decanoic acid             | 7.67 ± 0.74           |
| C <sub>12:0</sub>    | Dodecanoic acid           | 42.97 ± 1.55          |
| C <sub>14:0</sub>    | Tetradecanoic acid        | 10.09 ± 0.37          |
| C <sub>16:0</sub>    | Hexadecanoic acid         | 6.02 ± 0.49           |
| C <sub>18:0</sub>    | Octadecanoic acid         | 2.42 ± 0.08           |
| C <sub>18:1n9c</sub> | 9-octadecenoid acid       | 19.22 ± 0.85          |
| C <sub>18:2n6c</sub> | 9,12-octadecadienoid acid | 2.88 ± 0.14           |
| <b>Total</b>         |                           | <b>99.18 ± 0.49</b>   |

The analysis was made in triplicate. Saturated fatty acids: 77.08 ± 0.59%, Unsaturated fatty acids 22.10 ± 0.26%.

## 2.3. Nanocapsules Properties

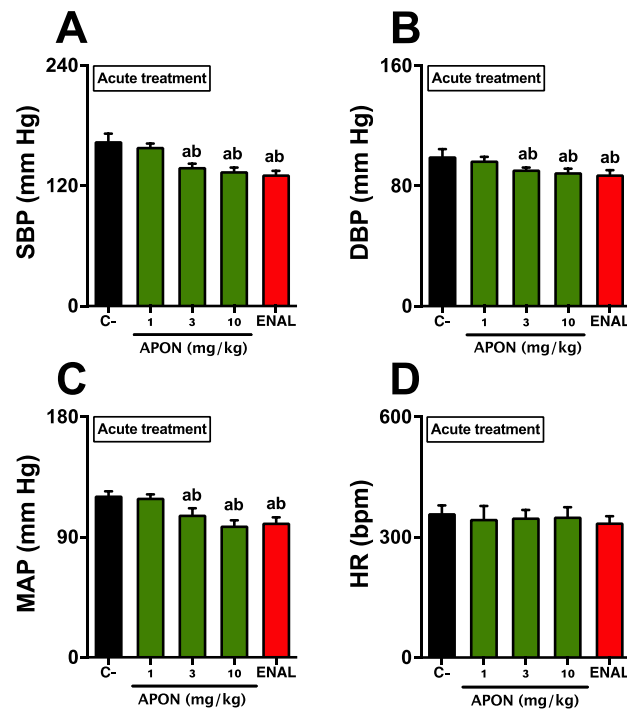
The particle size distribution and  $\zeta$ -potential of APON are shown in Figure 1. Nanocapsules showed a particle size of 196.90 nm (Figure 1A). The particle size distribution graph exhibits a narrow peak base, typical of a system with a low polydispersity index (0.159). Nanocapsules showed a  $\zeta$ -potential of -59.10 mV (Figure 1B), and a pH of 5.14.



**Figure 1.** Particle size distribution and  $\zeta$ -potential of *A. phalerata* kernel oil-loaded nanocapsules (APON).

## 2.4. Antihypertensive Effects of APON in SHR

After a 15 min stabilization period and before administering any substances, the baseline systolic blood pressure (SBP), the diastolic blood pressure (DBP), and the mean arterial pressure (MAP) of the animals (SHR) were recorded as 161.4 ± 4.2, 99.3 ± 3.9, and 122.5 ± 4.6 mmHg, respectively, while the heart rate (HR) was at 345 ± 39 beats per minute (bpm). Administering intraduodenal APON at doses of 3 and 10 mg/kg resulted in a decrease of approximately 20 mmHg in SBP, DBP, and MAP (Figure 2A–C). There was no noticeable effect on HR with any of the substances given (Figure 2D). Further analysis showed no statistically significant differences in the recorded data following the administration of enalapril (5 mg/kg) compared to receiving APON at doses of 3 and 10 mg/kg.

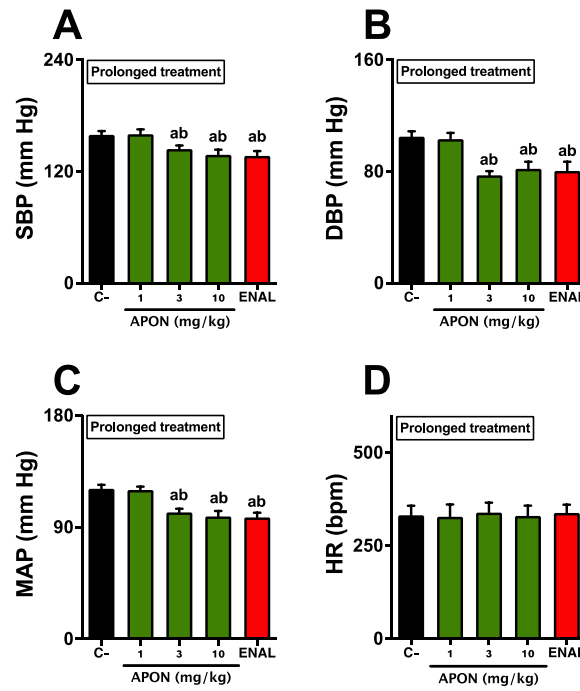


**Figure 2.** Acute antihypertensive effects of *Attalea phalerata* oil-loaded nanocapsules (APON). APON was administered intraduodenally in anesthetized rats. C-, effect of vehicle control (0.9% saline, 200  $\mu$ L). The results are expressed as mean  $\pm$  SEM ( $n = 6$ /group). <sup>a</sup> $p < 0.05$  when compared with respective control group; <sup>b</sup> $p < 0.05$  when compared with 1 mg/kg APON (ANOVA followed by Bonferroni post hoc test). DBP, diastolic blood pressure; HR, heart rate; MAP, mean arterial pressure; SBP, systolic blood pressure.

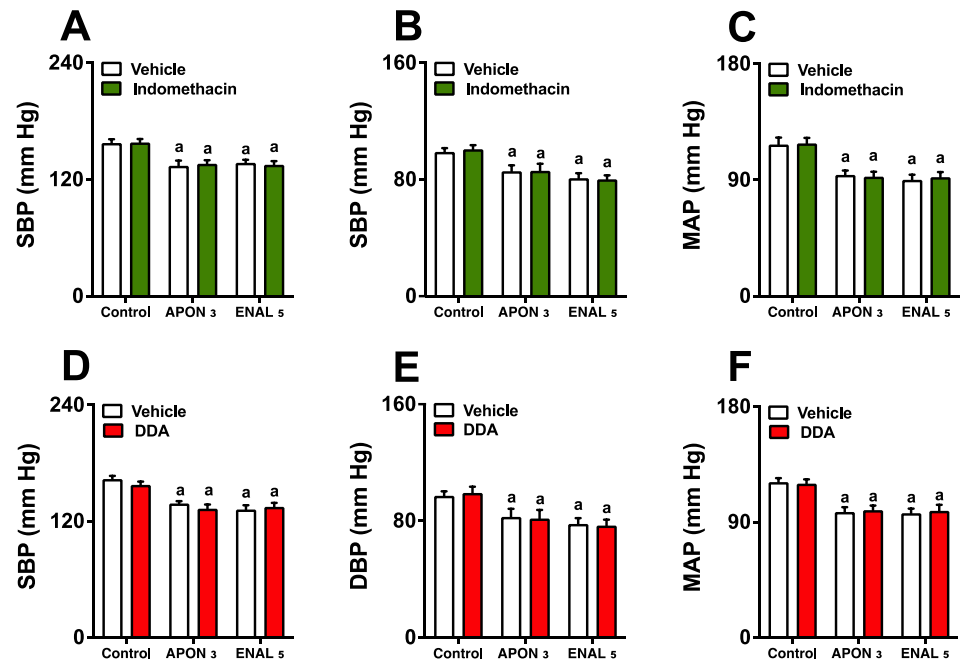
Seven days of oral administration of APON at doses of 3 and 10 mg/kg resulted in a significant decrease in blood pressure in all hypertensive rats. Basal measurements in control animals showed SBP, DBP, and MAP levels at  $166.3 \pm 4.7$ ,  $97.9 \pm 4.2$ , and  $120.3 \pm 4.0$  mmHg, respectively. However, in animals treated with 3 and 10 mg/kg of APON, the SBP, DBP, and MAP levels decreased to  $144.1 \pm 4.3$ ,  $75.9 \pm 4.8$ , and  $100.4 \pm 4.4$  mmHg, respectively (Figure 3A–C). It is important to note that heart rate did not show any significant changes with any of the treatments (Figure 3D). Additionally, SHR treated with enalapril also showed a significant decrease in blood pressure levels, comparable to the values seen in rats given 3 or 10 mg/kg of APON.

#### 2.5. Effects of the Prostaglandin/Cyclic Adenosine Monophosphate Pathway on the Antihypertensive Effects of the APON

The decrease in blood pressure caused by APON was not affected when combined with indomethacin (Figure 4A–C) or adenylate cyclase inhibitor 2',5'-dideoxyadenosine (DDA; Figure 4D–F). Furthermore, the use of indomethacin and DDA did not result in any changes in heart rate in any of the experimental groups (data not shown).



**Figure 3.** Sustained antihypertensive effects of *Attalea phalerata* oil-loaded nanocapsules (APON). APON was administered orally daily for 7 days. C-, effect of vehicle (filtered water, 300  $\mu$ L). The results are expressed as mean  $\pm$  SEM ( $n = 6$ /group). <sup>a</sup>  $p < 0.05$  when compared with respective control group; <sup>b</sup>  $p < 0.05$  when compared with 1 mg/kg APON (ANOVA followed by Bonferroni post hoc test). DBP, diastolic blood pressure; HR, heart rate; MAP, mean arterial pressure; SBP, systolic blood pressure.

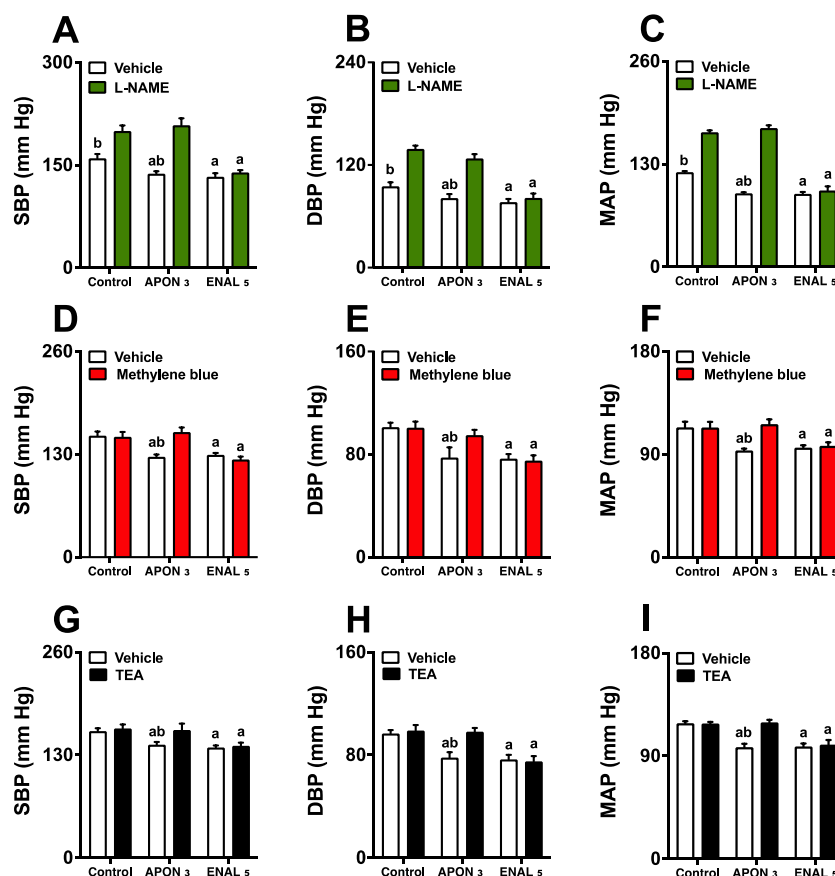


**Figure 4.** Absence of the involvement of the prostaglandin/cAMP pathway in the antihypertensive effect of *Attalea phalerata* oil-loaded nanocapsules (APON). The animals received APON (3 mg/kg, intraduodenally) in the presence and absence of an intraperitoneal injection of indomethacin (3 mg/kg) (A–C) or DDA (0.1 mg/kg) (D–F). <sup>a</sup>  $p < 0.05$  when compared with respective control group (ANOVA followed by Bonferroni post hoc test). DDA, 2',5'-dideoxyadenosine; DBP, diastolic blood pressure; MAP, mean arterial pressure; SBP, systolic blood pressure.

## 2.6. Effects of the NO-cGMP- $K^+$ Channel Pathways on the Antihypertensive Effects of the APON

The continuous administration of L-NAME resulted in a significant increase in systolic blood pressure (SBP) from  $171.1 \pm 5.1$  mmHg to  $205.6 \pm 8.7$  mmHg, diastolic blood pressure (DBP) from  $98.5 \pm 4.6$  mmHg to  $125.4 \pm 5.2$  mmHg, and mean arterial pressure (MAP) from

119.8 ± 4.7 mmHg to 154.7 ± 7.4 mmHg. L-NAME infusion impaired the ability of 3 mg/kg of APON to reduce SBP, DBP, and MAP, while only slightly affecting the effectiveness of enalapril (Figure 5A–C). Moreover, the administration of methylene blue (Figure 5D–F) or non-selective calcium-sensitive potassium channel blocker tetraethylammonium (TEA) (Figure 5G–I) abolished the antihypertensive effects of APON without changing the efficacy of enalapril.



**Figure 5.** Involvement of the nitric oxide/cGMP pathway and K<sup>+</sup> channels in the antihypertensive effect of *Attalea phalerata* oil-loaded nanocapsules (APON). The animals received APON (3 mg/kg, intraduodenally) in the presence and absence of a continuous infusion of L-NAME (7 mg/kg/min) (A–C), a continuous infusion of methylene blue (150 nmol/kg/min) (D–F), or an intraperitoneal injection of tetraethylammonium (400 µmol/kg) (G–I). The results are expressed as mean ± SEM (*n* = 6/group). <sup>a</sup> *p* < 0.05 when compared with respective control group; <sup>b</sup> *p* < 0.05 when compared with respective inhibitor (ANOVA followed by Bonferroni post hoc test). DBP, diastolic blood pressure; L-NAME, Nω-Nitro-L-arginine methyl ester; MAP, mean arterial pressure; SBP, systolic blood pressure; TEA, tetraethylammonium.

### 3. Discussion

The oil extracted for this study is a non-viscous and translucent liquid with a yellowish hue, with the smell of ripe fruit. The extraction process revealed a yielding of 35.25% (*w:w*). The APO refractive index, relative density, acidity value, iodine value, and saponification value agree with those reported by Acácio et al. [8]. APO exhibited a fatty acid profile with dodecanoic acid (C<sub>12:0</sub>) as the most abundant (42.97%) saturated acid and oleic acid (C<sub>18:1n9c</sub>) as the prevalent unsaturated fatty acid (19.22%). APO shares physicochemical characteristics consistent with the results described by Acácio et al. [8]. This fact occurs because we use the same raw material, methodology, and characterization methods. These properties play a crucial role as they can be used as quality control parameters to facilitate scalability for possible industrial production of the APO. Notably, beyond the research conducted by Acácio et al. [8] and our research, there are no existing studies focused on the use of APO. This lack of reference points underscores the need for further investigation, especially for potential commercial applications of this extractivist oil in cosmetics and pharmaceuticals.



The development of nanoencapsulated drugs based on ethnopharmacological knowledge provides a promising alternative for innovation in medicine. This approach combines efficiency and cost-effectiveness [10,11]. Nanophytopharmaceuticals have the capability to address challenges associated with herbal products, including low solubility, limited bioavailability, and shelf-life concerns. The APON exhibited a pH of 5.14, which is typical of nanocapsules prepared using Kollicoat MAE 100P [12,13]. On the other hand, APON presented a particle size of 196.90 nm with excellent homogeneity in size, represented by the narrow peak base and a low polydispersity index (0.159). The APON exhibited a  $\zeta$ -potential of -59.10 mV. The high modular value of  $\zeta$ -potential allows the occurrence of strong particle-particle interaction, keeping nanoparticles in suspension, preventing aggregation, precipitation, and agglomeration processes, thus enhancing the APON kinetic stability [5].

The effect of *A. phalerata* fruit kernel oil on blood pressure has not been investigated until today. In our investigation, we explored the antihypertensive effects of APON in SHR, uncovering the molecular mechanisms involved in the cardiovascular effects. As a first step, we perform a screening of the antihypertensive activity after a single administration via the duodenum. This procedure avoids interaction with stomach food and allows for better standardization of absorption time and pharmacological response. Additionally, we also evaluated the effect after 7 days of oral administration, aiming to determine if the antihypertensive effect would be sustained. In both cases, we observed that doses of 3 and 10 mg of APON were able to induce a similar antihypertensive effect; therefore, we chose to use the lower dose (3 mg/kg) for investigative studies on the mechanism of molecular action.

In recent decades, there has been a focus on the role of endothelium-derived vasoactive mediators in the cardiovascular field [14]. The endothelium regulates vascular homeostasis by synthesizing and releasing substances that either constrict or relax blood vessels in response to chemical (internal or external) or physical stimuli, such as shear stress and pulsatile stretch. While the nitric oxide and prostacyclin produced by endothelial cells have a significant impact on controlling the tone of large arteries, endothelium-derived hyperpolarizing factors play a crucial role in smaller resistance arteries [15]. Our study demonstrated that the antihypertensive effects of APON were not affected by inhibiting cyclooxygenase with indomethacin, nor by the use of DDA, a selective adenylate cyclase inhibitor. On the other hand, the use of L-NAME, a nitric oxide synthase inhibitor, as well as methylene blue (a guanylyl cyclase inhibitor), abolished the antihypertensive response to APON. Therefore, it is reasonable to suggest that APON-induced blood pressure reduction is directly influenced by the release of endothelial nitric oxide.

To investigate the role of downstream pathways in the nitric oxide-dependent activity of APON, we used a traditional  $K^+$  channel blocker, tetraethylammonium, which completely reversed the antihypertensive effects of APON. These results suggest that the activation of potassium channels is an important step for APON-induced antihypertensive effects. Given that the downstream targets of the nitric oxide pathway in blood vessels involve the opening of  $K^+$  channels [16], it is reasonable to propose that the NO-cGMP- $K^+$  channel pathway contributes to the endothelium-dependent effects of APON in the SHR.

Despite the valuable insights gained from our study, there are certain limitations that need to be considered. We recognize that our investigation did not delve into the specific mechanisms that may be responsible for modulating NO production or inactivation by APON. Due to the known interaction between antioxidants and NO availability, additional research is needed to clarify the exact mechanisms by which APON affects NO signaling and the implications it has on vascular function.

## 4. Materials and Methods

### 4.1. Chemicals

Heparin was obtained from Hipolabor in Belo Horizonte, MG, Brazil. Xylazine and ketamine hydrochloride were sourced from Syntec in São Paulo, SP, Brazil. Methylene blue, 2',5'-dideoxyadenosine (DDA), indomethacin, tetraethylammonium (TEA), and N $\omega$ -nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Kollicoat® MAE 100P was kindly supplied by BASF, SP, Brazil. Tween 80 was purchased from Crodapharma (Brazil).

#### 4.2. Plant Material

Ripe fruits of *A. phalerata* were harvested in the municipality of Jaraguari, Mato Grosso do Sul, Brazil (20°6'58" S 54°25'44" W). The Department of Botany at the Federal University of Mato Grosso do Sul confirmed the botanical identification of the species.

#### 4.3. Oil Extraction

Ripe fruits were air-dried at room temperature for 7 days. Subsequently, the kernels were separated from the fruit and ground using an electric grinder. The extraction was performed using 200 g of the grinding fruit kernel in 1000 mL of n-hexane. The mixture was placed in the dark for 7 days and stirred thrice a day. The n-hexane liquid holding the oil was filtered through filter paper to remove physical impurities and transferred to a rotary evaporator under vacuum at a temperature of 50 °C until complete solvent removal. The oil was stored in an amber bottle at room temperature until further use [7].

#### 4.4. Physicochemical Characterization

The organoleptic properties, such as color, aroma, and appearance of the APO, were documented. The physicochemical properties, including refractive index, relative density, acidity index, iodine value, and saponification value, were evaluated in accordance with the Brazilian Pharmacopeia [17].

#### 4.5. Gas Chromatography/Mass Spectroscopic Analysis

The fatty acid profile of the APO was evaluated following the methodology developed by Acácio et al. [7]. Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry (Shimadzu, model GC-2010, Japan) was used with a Flame Ionization Detector (FID) and a split/splitless injector. The separation was carried out on a 30 m fused silica capillary column with a diameter of 0.25 mm, BPX-70 (70% Cyanopropyl polysilphenylenesiloxane) from Sigma Aldrich, USA. The operating parameters were as follows: detector temperature of 250 °C, injector temperature of 250 °C. The initial column temperature was set at 80 °C (3 min), gradually increased to 140 °C at a rate of 10 °C/min, further increased to 240 °C at a rate of 5 °C/min, and held at that temperature for 11 min. Helium (from White Martins, Brazil) was used as the carrier gas with a flow rate of 1.0 mL/min, synthetic air and hydrogen as the detector gas, and nitrogen as the auxiliary gas (make-up gas). The injection volume was 1 µL. Identification and quantification of fatty acids were performed by comparing the retention time of fatty acid methyl esters in the sample with that of the standard (FAME mix, 100 mg—37 components). The quantitation was expressed as a percentage of the total found fatty acids.

The analytical methodology was developed and validated for this purpose. The method's recovery (accuracy) was  $100 \pm 2.11\%$ , the precision was  $\pm 1.12\%$ , the limit of detection (LOD) was 2.50 ppm, and the limit of quantification (LOQ) was 8 ppm. The mean and the standard deviation of three replicates were reported.

#### 4.6. Nanocapsules Preparation

The Acurí oil-loaded nanocapsules were synthesized using the nanoprecipitation method [18] with some modifications [7]. For the preparation of the organic phase, 1 g of Kollicoat® MAE 100P was dissolved in 20 mL of a mixture of absolute ethanol and acetone (3:1). The mixture was stirred at 400 rpm for 7 min. Then, 0.5 g of Span80 and 0.5 g of Acurí oil were added, with the stirring kept at 400 rpm for 10 more min. The aqueous phase consisted of 100 mL of Milli-Q water and 0.5 g of the non-ionic surfactant Tween 80. The organic phase was added dropwise to the aqueous phase with agitation (650 rpm) and stirred for 15 min. The mixture was sonicated using an ultrasonic probe (Sonics Vibra-Cell VCX 750, Brazil) with a power of 8.0 W for 7 min. Then, the solvent mixture was evaporated on a heating plate at 50 °C with magnetic stirring at 650 rpm for 24 h. The nanocapsule suspension was transferred to an amber vial; the volume was adjusted to 100 mL with Milli-Q water, and it was stored at  $25 \pm 2$  °C for 24 h prior to characterization [7,9].

#### 4.7. Nanocapsules Characterization

##### 4.7.1. Particle Size and Polydispersity Index

The particle size and homogeneity (polydispersity index) were assessed using Photon Correlation Spectroscopy with a Zetasizer Nano ZS instrument (Malvern, UK). The measurements were conducted at a laser wavelength of 633 nm, scattering angle of 173°, and temperature of 25 °C. Three measurements were taken for each sample, and the mean  $\pm$  standard deviation was reported [7,9].

#### 4.7.2. $\zeta$ -Potential

The  $\zeta$ -potential was measured using Electrophoretic Light Scattering in a Zetasizer Nano ZS (Malvern, UK) with gold electrode polycarbonate cuvettes (DTS1060, UK). The measurements were conducted at 25 °C with a voltage of 150 V. Three replicates were carried out, and the results were reported as mean  $\pm$  standard deviation [7,9].

#### 4.7.3. pH Evaluation

The pH of the suspension of nanocapsules was measured using a pH meter (Gehaka PG2000). The equipment was calibrated using buffer solutions of pH 4, 7, and 10 before taking the measurements. The measurements were carried out in triplicate.

#### 4.8. Animals

Three-month-old male SHR rats, weighing 310–340 g, were obtained from the animal facility at the Federal University of Grande Dourados (UFGD). The rats were housed in a controlled vivarium with a 12-h light/dark cycle, maintained at a temperature of  $22 \pm 3$  °C and a humidity level of 50–60%. They were provided with *ad libitum* access to filtered water and standard food pellets. All animal handling procedures were conducted in accordance with the guidelines approved by the Ethics Committee in Animal Experimentation of UFGD (protocol no. 07/2020).

#### 4.9. Investigation of APON Effects on Arterial Pressure and Heart Rate

To evaluate the acute effects of APON, male spontaneously hypertensive rats (SHR) were subjected to continuous anesthesia via inhalation of isoflurane (2 to 3%). Additionally, each rat received a single subcutaneous injection of heparin (50 IU). Subsequently, the left carotid artery was cannulated and connected to a pressure transducer, which was interfaced with the PowerLab data acquisition system utilizing LabChart 8 software (ADI Instruments, Castle Hill, Australia) to recording SBP, DBP, MAP, and HR levels. After this procedure, different groups of rats ( $n = 6$ ) received varying doses of APON (1, 3, or 10 mg/kg) or enalapril (5 mg/kg) via intraduodenal administration. The control group was given intraduodenal administration of a vehicle (0.9% saline) at a consistent volume of 100  $\mu$ L per 100 g body weight. Changes in arterial pressure and heart rate (HR) were monitored for 35 min following the treatments.

To evaluate the blood pressure-lowering effects after extended treatment, distinct groups of rats ( $n = 6$  per group) were given oral doses of APON (1, 3, or 10 mg/kg), enalapril (5 mg/kg), or a control (filtered water; 100  $\mu$ L/100 g body weight) once a day for 7 days. On the 8th day, the rats were anesthetized with continuous inhalation of isoflurane (2–3%) and underwent the same surgical procedure as previously described. Changes in blood pressure and heart rate were monitored for 35 min. Each rat received only one substance being studied during both acute and prolonged treatment stages. At the end of the experiments, euthanasia was carried out by administering an overdose of isoflurane inhalation (30–40%).

#### 4.10. Involvement of the Prostaglandin/Cyclic Adenosine Monophosphate, Nitric Oxide/Cyclic Guanosine Monophosphate Pathways, as well as $K^+$ Channels, in the APON Antihypertensive Effects

After isoflurane anesthesia (2–3%), the left femoral vein was cannulated in different groups of spontaneously hypertensive rats ( $n = 6$ /group) and connected to an infusion pump (EFF 311, Insight, Ribeirão Preto, Brazil). Subsequently, L-NAME (a non-selective nitric oxide synthase inhibitor; 7 mg/kg/min) or methylene blue (a guanylyl cyclase inhibitor; 150 nmol/kg/min) was continuously infused, or a single injection of DDA (selective adenylate cyclase inhibitor; 0.1 mg/kg), indomethacin (a nonselective cyclooxygenase inhibitor; 3 mg/kg), or TEA (non-selective  $K^+$  channel blocker; 400  $\mu$ mol/kg) was administered intraperitoneally. Afterward, APON (3 mg/kg) was administered via the intraduodenal route, and arterial pressure levels were recorded for 35 min. Each rat received only one of the substances

being investigated. The total volume injected into the animals during the infusion period was 1000  $\mu$ L. At the end of the experiments, all animals were euthanized using an overdose of isoflurane (30–40% by inhalation).

#### 4.11. Statistical Analyses

Statistical analyses were performed using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Bonferroni post hoc test. Results are expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean of 6 animals per group. Statistical significance was set at  $p < 0.05$ . GraphPad Prism 10 for macOS (San Diego, CA, USA) was used for constructing the graphs and for all statistical analyses.

### 5. Conclusion

Our study demonstrated a significant antihypertensive effect of *Attalea phalerata* oil-loaded nanocapsules in spontaneously hypertensive rats (SHR) following both acute and prolonged (7-day) administration. This effect appears to be dependent on the function of the vascular endothelium and involves the NO-cGMP-K<sup>+</sup> channel pathway. By elucidating this pathway's involvement, our findings contribute to a deeper mechanistic understanding of APON's pharmacological effect. This work reports, for the first time, the potential therapeutic value of APON for hypertension management, along with the mechanistic insights into its cardiovascular effects. This research opens a new avenue for future investigations aimed at definitively establishing APON's therapeutic utility in managing cardiovascular disease.

### 6. Patent

Jesus Rafael Rodríguez Amado, Ariadna Lafourcade Prada; Bianca Rodrigues Acácio; Marco Antônio Utrera Martines; Renata Trentin Perdomo. Compositions containing oil from acurí fruits (*Scheelea phalerata* (Mart. ex Spreng.) Burret: Pharmacologic, cosmetic, and nutraceutical utilities (in Portuguese). Under deposit number: BR 102022015777-4 A2. Nacional Institute of Industrial Property (INPI), Brazil. Deposit date: 09/08/2022. Publication date: 20/02/2024. Revista da Propriedade Industrial, Brazil. <https://revistas.inpi.gov.br/rpi/>. Section VI, Patents: p. 224.

**Author Contributions:** M.M.d.A., S.B.B.T., J.V.d.S., D.A.T.d.A., M.A.U.M., A.L.P., J.R.R.A., F.A.d.R.L., and A.G.J., methodology, formal analysis, investigation, and data curation. A.G.J., F.A.d.R.L. and J.R.R.A., writing—original draft preparation. A.G.J., project administration, conceptualization, supervision, writing—review and editing. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by CAPES Higher Education Improvement Coordination., grant number 88887.910272/2023-00.

**Institutional Review Board Statement:** The animal study protocol was approved by the Ethics Committee in Animal Experimentation of UFGD (protocol code 07/2020). All animal handling procedures were conducted in accordance with the guidelines approved by the Ethics Committee in Animal Experimentation of UFGD (protocol no. 07/2020).

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:**

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflicts of interest.

## References

1. Timmis, A.; Vardas, P.; Townsend, N.; Torbica, A.; Katus, H.; De Smedt, D.; Gale, C.P.; Maggioni, A.P.; Petersen, S.E.; Huculeci, R.; et al. European Society of Cardiology: cardiovascular disease statistics 2021. *Eur. Heart J.* **2022**, *43*, 716–799. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehab892>
2. Townsend, N.; Kazakiewicz, D.; Wright, F.L.; Timmis, A.; Huculeci, R.; Torbica, A.; Gale, C.P.; Achenbach, S.; Weidinger, F.; Vardas, P. Epidemiology of cardiovascular disease in Europe. *Nat. Rev. Cardiol.* **2022**, *19*, 133–143. <https://doi.org/10.1038/s41569-021-00607-3>
3. Butnariu, M.; Fratantonio, D.; Herrera-Bravo, J.; Sukreet, S.; Martorell, M.; Robertovna, G.E.; Les, F.; López, V.; Kumar, M.; Pentea, M.; et al. Plant-food-derived bioactives in managing hypertension: From current findings to upcoming effective pharmacotherapies. *Curr. Top. Med. Chem.* **2023**, *23*, 589–617. <https://doi.org/10.2174/1568026623666230106144509>

4. Singhai, H.; Rathee, S.; Jain, S.K.; Patil, U.K. The potential of natural products in the management of cardiovascular disease. *Curr. Pharm. Des.* **2024**, *30*, 624–638. <https://doi.org/10.2174/0113816128295053240207090928>
5. Dewanjee, S.; Chakraborty, P.; Mukherjee, B.; De Feo, V. Plant-Based Antidiabetic Nanoformulations: The Emerging Paradigm for Effective Therapy. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 2217. <https://doi.org/10.3390/ijms21062217>
6. Shahid, N.; Erum, A.; Hanif, S.; Malik, N.S.; Tulain, U.R.; Syed, M.A. Nanocomposite hydrogels- a promising approach towards enhanced bioavailability and controlled drug delivery. *Curr. Pharm. Des.* **2024**, *30*, 48–62. <https://doi.org/10.2174/0113816128283466231219071151>
7. de Lima, F.F.; Lescano, C.H.; Arrigo, J.d.S.; Cardoso, C.A.L.; Coutinho, J.P.; Moslaves, I.S.B.; Ximenes, T.V.D.N.; Kadri, M.C.T.; Weber, S.S.; Perdomo, R.T.; et al. Sanjinez, Anti-inflammatory, antiproliferative and cytoprotective potential of the *Attalea phalerata* Mart. ex Spreng. pulp oil. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0195678. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0195678>
8. Acácio, B.R.; Prada, A.L.; Neto, S.F.; Gomes, G.B.; Perdomo, R.T.; Nazario, C.E.D.; Neto, E.S.; Martines, M.A.U.; de Almeida, D.A.T.; Junior, A.G.; et al. Cytotoxicity, anti-inflammatory effect, and acute oral toxicity of a novel *Attalea phalerata* kernel oil-loaded nanocapsules. *Biomed. Pharmacother.* **2024**, *174*, 116308. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2024.116308>
9. de Lima, F.F.; Traesel, G.K.; Menegati, S.E.L.T.; dos Santos, A.C.; Souza, R.I.C.; de Oliveira, V.S.; Sanjinez-Argandoña, E.J.; Cardoso, C.A.L.; Oesterreich, S.A.; Vieira, M.D.C. Acute and subacute oral toxicity assessment of the oil extracted from *Attalea phalerata* Mart ex Spreng. pulp fruit in rats. *Food Res. Int.* **2017**, *91*, 11–17. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.11.019>
10. Sharma, N.; Vasisht, K.; Kaur, J.; Sandhu, S.K.; Dey, K.; Hameed, B.A.; Bajaj, R.; Kaur, I.P.; Karan, M. Blending Ethnomedicine with Modern Technology-From Conventional to Tailored Products: Modulating Biopharmaceutical Properties of *Berberis* Extract by Solid Lipid Nanoparticles for Wound Healing. *J. Funct. Biomater.* **2023**, *14*, 418. <https://doi.org/10.3390/jfb14080418>
11. McClements, D.J. Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences, and similarities. *Soft Matter*. **2012**, *8*, 1719–1729. <https://doi.org/10.1039/c2sm06903b>
12. Acacio, B.R.; Robles, V.; Prada, A.; Assis, J.; Souza, T.; Keita, H.; Neto, S.; Gamero, E.J.P.; Amado, J.R.R. Kollicoat MAE® 100P as a film former polymer for nanoparticles preparation. *Rev. Colomb. De Cienc. Químico-Farm.* **2023**, *51*, 1–10. <https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v51n3.100424>
13. Neto, S.F.; Prada, A.L.; Achod, L.D.R.; Torquato, H.F.V.; Lima, C.S.; Paredes-Gamero, E.J.; de Moraes, M.O.S.; Lima, E.S.; Sosa, E.H.; de Souza, T.P.; et al.  $\alpha$ -amyrin-loaded nanocapsules produce selective cytotoxic activity in leukemic cells. *Biomed. Pharmacother.* **2021**, *139*, 111656. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111656>
14. Bkaily, G.; Jacques, D. Morphological and Functional Remodeling of Vascular Endothelium in Cardiovascular Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 1998. <https://doi.org/10.3390/ijms24031998>
15. Lim, X.R.; Harraz, O.F. Mechanosensing by Vascular Endothelium. *Annu. Rev. Physiol.* **2024**, *86*, 71–97. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-042022-030946>
16. Li, C.; Yang, Y. Advancements in the study of inward rectifying potassium channels on vascular cells. *Channels* **2023**, *17*, 2237303. <https://doi.org/10.1080/19336950.2023.2237303>
17. ANVISA. Farmacopeia Brasileira. Vol 1. (Agência Nacional de Vigilância Sanitária, ed.), 2019.
18. Fessi, H.; Puisieux, F.; Devissaguet, J.P.; Ammoury, N.; Benita, S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *Int. J. Pharm.* **1989**, *55*, R1–R4. [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(89\)90281-0](https://doi.org/10.1016/0378-5173(89)90281-0)

**Disclaimer/Publisher’s Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.