

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

**INFUSO DAS FOLHAS DA GUAVIRA (*CAMPOMANESIA PUBESCENS*
(D.C.) O. BERG): ESTUDO FITOQUÍMICO, TOXICIDADE PRÉ-
CLÍNICA E EFEITOS BIOLÓGICOS EM RATOS WISTAR**

DIOELEN VIRGÍNIA BORGES SOUZA DE AQUINO COELHO

**Dourados - MS
2023**

DIOELEN VIRGÍNIA BORGES SOUZA DE AQUINO COELHO

INFUSO DAS FOLHAS DA GUAVIRA (*CAMPOMANESIA PUBESCENS*
(D.C.) O. BERG): ESTUDO FITOQUÍMICO, TOXICIDADE PRÉ-CLÍNICA
E EFEITOS BIOLÓGICOS EM RATOS WISTAR

Área do CNPq: Ciências da Saúde: 04.00.00.00-1.

Exame de Defesa apresentado 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^a. Dr^a. Silvia Aparecida Oesterreich

Co-orientador: Prof. Dr. Márcio Eduardo de Barros

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

C672i Coelho, Dioelen Virgínia Borges Souza De Aquino
INFUSO DAS FOLHAS DA GUAVIRA (CAMPOMANESIA PUBESCENS (D.C.) O. BERG):
ESTUDO FITOQUÍMICO, TOXICIDADE PRÉ- CLÍNICA E EFEITOS BIOLÓGICOS EM
RATOS WISTAR [recurso eletrônico] / Dioelen Virgínia Borges Souza De Aquino Coelho. -- 2024.
Arquivo em formato pdf.

Orientadora: Silvia Aparecida Oesterreich.

Coorientador: Marcio Eduardo de Barros.

Tese (Doutorado em Ciências da Saúde)-Universidade Federal da Grande Dourados, 2023.

Disponível no Repositório Institucional da UFGD em:

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

1. Myrtaceae. 2. Gabiroba. 3. Toxicogenética. 4. Anti-hiperglicêmicos. I. Oesterreich, Silvia
Aparecida. II. Barros, Marcio Eduardo De. III. 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 DIOELEN VIRGÍNIA BORGES SOUZA DE AQUINO COELHO, ALUNA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM CIÊNCIAS DA SAÚDE, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO "FARMACOLOGIA".

Aos vinte e oito dias do mês de julho do ano de dois mil e vinte e três, às oito horas, em sessão pública, realizou-se na Universidade Federal da Grande Dourados, a Defesa de Tese de Doutorado intitulada **"INFUSO DAS FOLHAS DA GUAVIRA (*Campomanesia pubescens* (D.C.) O. Berg): Estudo fitoquímico, TOXICIDADE PRÉ-CLÍNICA E EFEITOS BIOLÓGICOS em ratos WISTAR"**, apresentada pela doutoranda Dioelen Virgínia Borges Souza de Aquino Coelho, do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, à Banca Examinadora constituída pelos membros: Prof. Dr. Marcio Eduardo de Barros/UFGD (presidente/coorientador), Prof. Dr. Pablo Christiano Barboza Lollo/UFGD (membro titular interno), Prof.^a Dr.^a Cláudia Andréa Lima Cardoso/UEMS (membro titular externo), Prof.^a Dr.^a Maria do Carmo Vieira/UFGD (membro titular externo), Prof. Dr. Gustavo Roberto Villas Boas/UFOB (membro titular externo). Iniciados os trabalhos, a presidência deu a conhecer ao candidato e aos integrantes da banca as normas a serem observadas na apresentação da Tese. Após a candidata 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 a candidata considerada **APROVADA**. O Presidente da Banca atesta a participação dos membros que estiveram presentes de forma remota, conforme declarações anexas. Nada mais havendo a tratar, lavrou-se a presente ata, que vai assinada pelos membros da Comissão Examinadora.

Dourados/MS, 28 de julho de 2023.

Prof. Dr. Marcio Eduardo de Barros
Presidente/coorientador

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

Prof.^a Dr.^a Cláudia Andréa Lima Cardoso
Membro Titular Externo
(Participação Remota)

Prof.^a Dr.^a Maria do Carmo Vieira
Membro Titular Externo
(Participação Remota)

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

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus avós
(*in memoriam*) Samuel Claudino de
Souza e Virgínia Cristovam de
Souza.

EPÍGRAFE

Porque para Deus nada é impossível.

Lucas 1:37

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Imagem ilustrativa da <i>Campomanesia pubescens</i>	17
Figura 2. Desenho experimental de toxicidade aguda	29
Figura 3. Desenho experimental de toxicidade aguda até a eutanásia	31
Figura 4. Dano ao DNA por meio do ensaio cometa	36
Figura 5. Células obtidas a partir do teste do micronúcleo in vivo	37
Figura 6. Células obtidas a partir do teste do micronúcleo in vivo	39
Figura 7. Desenho experimental da atividade anti-hiperglicemiante	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação taxonômica da espécie <i>Campomanesia pubescens</i>	16
Tabela 2 – Proporção de solvente durante a análise cromatográfica	22

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Substâncias/classes químicas identificadas e/ou isoladas e atividades biológicas de espécies do gênero <i>Campomanesia</i>	18
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

μL	<i>Microliter</i> (Microlitro)
ALT	<i>Alanine aminotransferase</i> (Alanina aminotransferase)
ANOVA	<i>Analysis of variance</i> (Análise de variância)
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AST	<i>Aspartate aminotransferase</i> (Aspartato aminotransferase)
bw	<i>Body weight</i> (Peso corporal)
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CNS	<i>Central nervous system</i> (Sistema nervoso central)
DAD	<i>Diode array detector</i> (Detector de arranjo de diodos)
DL50	Dose letal média
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (Ácido desoxirribonucleico)
DPPH	<i>2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl</i> (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo)
FDA	<i>Food and Drugs Administration</i> (Administração de Alimentos e Drogas)
g	<i>Gram</i> (Grama)
H&E	<i>Hematoxylin-eosin</i> (Hematoxilina-eosina)
HDL	<i>High density lipoprotein</i> (Lipoproteína de alta densidade)
HPLC	<i>High-performance liquid chromatography</i> (Cromatografia líquida de alta eficiência)
kg	<i>Kilogram</i> (Quilograma)
LD50	<i>Median lethal dose</i> (Dose letal média)
LDL	<i>Low density lipoprotein</i> (Lipoproteína de baixa densidade)
LH	<i>Luteinizing hormone</i> (Hormônio luteinizante)
LOAEL	<i>Low observed adverse effect level</i> (Menor dose com efeito adverso observado)
LOEL	<i>Low observed effect level</i> (Menor dose com efeito observado)
MCH	<i>Mean corpuscular hemoglobin</i> (Hemoglobina corpuscular média)
MCHC	<i>Mean corpuscular hemoglobin concentration</i> (Concentração de hemoglobina corpuscular média)
mg	<i>Milligram</i> (Miligrama)
mL	<i>Mililiter</i> (Mililitro)
MN-PCEs	<i>Micronucleated polychromatic erythrocytes</i> (Eritrócitos policromáticos micronucleados)

NOAEL	<i>No observed adverse effect level</i> (Dose de efeito adverso não observado)
NOEL	<i>No observed effect level</i> (Dose de efeito não observado)
OECD	<i>Organisation for Economic Cooperation and Development</i> (Organização para a Cooperação de Desenvolvimento Econômico)
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCEs/NCE	<i>Polychromatic to normochromatic erythrocytes ratio</i> (Razão entre eritrócitos policromáticos e normocromáticos)
RDW	<i>Red cell distribution width</i> (Amplitude de distribuição dos eritrócitos)
SEM	<i>Standard error of the mean</i> (Erro padrão da média)
SINITOX	Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas

INFUSO DAS FOLHAS DA GUAVIRA (*Campomanesia pubescens* (D.C.) O. Berg): ESTUDO FITOQUÍMICO, TOXICIDADE PRÉ-CLÍNICA E EFEITOS BIOLÓGICOS em ratos WISTAR

RESUMO

As plantas continuam sendo uma importante fonte de compostos bioativos e seu estudo requer uma abordagem multidisciplinar que combina técnicas etnobotânicas, fitoquímicas e biológicas para identificar novos compostos com fins terapêuticos. Popularmente conhecida como guavira, a *Campomanesia pubescens* (D.C.) O. Berg é uma planta frutífera, símbolo do Mato Grosso do Sul, que tem se mostrado promissora quanto às propriedades terapêuticas e efeitos biológicos, reportados pelo uso etnofarmacológico e identificados por estudos, como flavononas e chalconas, entre elas 2',4'-dihidroxi-3',5'-dimetil-6' metoxicalcona. Contudo, na literatura não foram encontrados estudos relativos à sua toxicidade e efeitos biológicos (renais e anti-hiperglicemiantes). Desta forma, este trabalho teve como objetivo realizar o estudo fitoquímico, avaliação de toxicidade, mutagenicidade e os efeitos biológicos do infuso das folhas de *C. pubescens*. Para o teste de toxicidade aguda, 10 ratos Wistar fêmeas receberam uma dose única de 2000 mg/kg de peso corporal do chá de *C. pubescens* por gavagem e foram observados durante 14 dias. Para toxicidade subaguda, machos e fêmeas Wistar receberam doses repetidas de 15, 40 e 250 mg/kg de peso corporal do chá de *C. pubescens* por via oral, sendo tratados e observados durante 28 dias e, após esse período de tratamento, um grupo satélite e controle satélite permaneceram em observação por mais 14 dias. Para verificar os efeitos renais os mesmos ratos machos usados no ensaio de toxicidade subaguda foram avaliados no dia zero e no 28^o dia de experimento. Os resultados foram avaliados por análise variância multivariada permutacional (Permanova). Quando constatada diferença significativa entre os grupos foi utilizado escalonamento multidimensional não métrico (nMDS) e análise de componentes principais (PCA), seguido do teste de Bonferroni. No ensaio de toxicidade aguda, a DL₅₀ foi estimada como maior do que 2000 mg/kg. Na toxicidade a longo prazo, as doses testadas não produziram alterações significativas nos parâmetros fisiológicos, comportamentais, hematológicos ou histopatológicos nos animais. Portanto, não exibiu toxicidade aguda, subaguda, sendo classificada como grau V, ou seja, apresenta baixo risco de toxicidade. O chá teve efeito renal com aumento do volume urinário relativo do dia 0 para o dia 28. Entretanto, não se constatarem efeitos anti-hiperglicêmicos. O perfil fitoquímico do

chá de *C. pubescens* indicou altos teores de flavonoides, atividade antibacteriana (MIC) e antioxidante. Recomenda-se que novos estudos do chá das folhas de *C. pubescens* sejam realizados para elucidar o mecanismo de ação nos efeitos renais e verificar a toxicidade em doses repetidas com exposição prolongada maior que 28 dias.

Palavras-chave: Myrtaceae. Gabiroba. Toxicogenética. Anti-hiperglicêmicos.

GUAVIRA LEAF INFUSION (*Campomanesia pubescens* (D.C.) O. Berg): PHYTOCHEMICAL STUDY, PRE-CLINICAL TOXICITY AND BIOLOGICAL EFFECTS in WISTAR rats

ABSTRACT

Plants continue to be an essential source of bioactive compounds, and their study requires a multidisciplinary approach that combines ethnobotanical, phytochemical, and biological techniques to identify new compounds with therapeutic purposes. Popularly known as guavira, *Campomanesia pubescens* (D.C.) O. Berg is a fruit plant, the symbol of Mato Grosso do Sul, which has shown promise in terms of therapeutic properties and biological effects, reported by ethnopharmacological use and identified by studies as flavonones and chalcones, including 2',4'-dihydroxy-3',5'-dimethyl-6' methoxyalcone. However, no studies were found in the literature regarding its toxicity and biological effects (renal and antihyperglycemic agents). Thus, this work aimed to carry out a phytochemical study, assessment of toxicity, mutagenicity, and biological effects of the infusion of leaves of *C. pubescens*. For the acute toxicity test, 10 female Wistar rats received a single dose of 2000 mg/kg body weight of *C. pubescens* tea by gavage and were observed for 14 days. For subacute toxicity, male and female Wistar received repeated doses of 15, 40 and 250 mg/kg of body weight of *C. pubescens* tea orally, being treated and observed for 28 days and, after this period of treatment, a group satellite and satellite control remained under observation for another 14 days. To verify the renal effects, the same male rats used in the subacute toxicity test were evaluated on day zero and on the 28th day of the experiment. Results were evaluated by permutational multivariate analysis of variance (Permanova). When a significant difference was found between the groups, non-metric multidimensional scaling (nMDS) and principal component analysis (PCA) were used, followed by the Bonferroni test. In the acute toxicity assay, the LD50 was estimated to be greater than 2000 mg/kg. In long-term toxicity, the doses tested did not produce significant changes in physiological, behavioral, hematological or histopathological parameters in the animals. Therefore, it did not exhibit acute and subacute toxicity, being classified as grade V, that is, it presents a low risk of toxicity. The tea had a renal effect with increased relative urinary volume from day 0 to day 28. However, no antihyperglycemic effects were observed. The phytochemical profile of *C. pubescens* tea

indicated high levels of flavonoids, antibacterial (MIC), and antioxidant activity. It is recommended that new studies of tea from the leaves of *C. pubescens* be carried out to elucidate the mechanism of action on the renal effects and verify the toxicity in repeated doses with prolonged exposure greater than 28 days.

Keywords: Myrtaceae. Gabiroba. Toxicogenetics. Antihyperglycemic.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 Família Myrtaceae	15
2.2 O gênero <i>Campomanesia</i> e a espécie <i>Campomanesia pubescens</i>	16
2.3 Composição química e atividades biológicas do gênero <i>Campomanesia</i>	17
2.3.1 Composição química do chá de <i>Campomanesia pubescens</i>	21
2.3.1.1 Cromatografia Líquida de Alto Desempenho (HPLC)	21
2.3.1.2 Compostos fenólicos	22
2.3.1.3 Flavonoides	22
2.3.1.4 Taninos	23
2.3.1.5 Saponinas	23
2.3.1.6 Atividade Antioxidante pelo método DPPH	23
2.3.1.7 Análise do potencial fotoprotetor	23
2.3.1.8 Avaliação da atividade antibacteriana	24
2.4 Ensaios de toxicidade <i>in vivo</i>	24
2.4.1 Teste de toxicidade com <i>Artemia salina</i>	25
2.4.2 Toxicidade aguda	25
2.4.2.1 Desenho experimental de toxicidade aguda	27
2.4.3 Toxicidade subaguda	29
2.4.3.1 Desenho experimental de toxicidade subaguda	30
2.4.4 Toxicogenética	31
2.4.5 Genotoxicidade	33
2.4.5.1 Ensaio cometa	34
2.4.5.2 Delineamento experimental do ensaio cometa	35
2.4.6 Mutação gênica e teste do micronúcleo	36
2.4.6.1 Delineamento experimental do teste do micronúcleo	38
2.5 Análise histopatológica	38
2.6 Delineamento experimental de efeitos renais	38
2.7 Análise bioquímica e hematológica	39
2.8 Atividade anti-hiperglicemiante em ratos Wistar	40
2.8.1 Delineamento experimental do bioensaio de atividade anti-hiperglicêmica	40
2.8.2 Teste Oral de Tolerância à Glicose (TOTG)	41
2.8.3 Determinação do glicogênio hepático, muscular e dissacaridases intestinais	41

2.9 Tratamento dos dados	42
3 OBJETIVOS	44
3.1 Geral	44
3.2 Específicos	44
5 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46
5 APÊNDICES	62
5.1 Artigo 1: EVALUATION OF THE PRECLINICAL TOXICITY AND DIURETIC EFFECTS OF THE LEAF INFUSION OF <i>Campomanesia pubescens</i> IN RATS	63
5.2 Artigo 2: EVALUATION OF CAMPOMANESIA PUBESCENS LEAVES INFUSION: ANALYSIS OF TOXICOGENETICS AND ANTIHYPERGLYCEMIC ACTIVITY IN RATS	91
6 CONCLUSÃO	118
7 ANEXOS	119

1 INTRODUÇÃO

A utilização das plantas no tratamento das enfermidades que acometem a espécie humana remonta a idade antiga (CALIXTO, 2005; KOEHN e CARTER, 2007). Certamente, as terapias em uso, composta por medicamentos, com ações específicas sobre receptores, enzimas e canais iônicos, não teriam atingido o grau de desenvolvimento se não fosse o auxílio dos produtos naturais, notadamente aqueles derivados das plantas superiores (CALIXTO, 2005; EKOR, 2014).

A procura por princípios ativos em plantas nativas vem crescendo, em função de suas ações terapêuticas observadas, na forma de chás ou outros. O Estado do Mato Grosso do Sul, Brasil, apresenta grande diversidade de plantas nativas e, entre elas, as espécies do gênero *Campomanesia*, popularmente conhecidas como guaviras. À medida que o consumo global de extratos vegetais aumenta, também surgem preocupações em relação à segurança do uso destes produtos. Muitas plantas consumidas pela população, embora tenham potencial biológico promissor, não foram avaliadas quanto a seus possíveis efeitos adversos e tóxicos (RAYNOR et al., 2011; MELO-REIS et al., 2011; REGNER et al., 2011; SHIN et al., 2011; GUERRERO et al., 2010).

O gênero *Campomanesia* pertence à família Myrtaceae (VALLILO et al., 2008; SILVA e FONSECA, 2016), em afluência no Cerrado brasileiro, sendo muito utilizadas *in natura* e em doces, bebidas, aromatizantes e sorvetes (SANGALLI et al., 2002; MACHATE et al., 2020). Estudos demonstraram que as folhas da espécie *Campomanesia pubescens* (D.C.) O. Berg (guavira), colhidas em áreas nativas de Mato Grosso do Sul (MS), apresentaram efeito anti-inflamatório devido à redução dos monócitos circulantes (GUERRERO et al., 2010) e efeito antioxidante frente ao método do β -caroteno/ácido linoleico (CARDOSO et al., 2009) e do 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH) (ROCHA; MORAIS; CHANG, 2011; COELHO et al., 2023).

As espécies do gênero apresentam biotividades comprovadas pelo uso popular. Sobre a *C. xanthocarpa*, o extrato hidroetanólico (folhas) apresentou atividade antiulcerogênica (MARKMAN et al., 2004); atividade antibacteriana foi verificada na fração hexânica (folhas) e atividade antifúngica foi observada na fração aquosa (folhas e flores) (Sá et al. 2018); o extrato etanólico (frutos) demonstrou atividade antidiarreica (SOUZA-MOREIRA et al., 2011); atividade hipolipidêmica e antiplaquetária foi observada no infuso das folhas (KLAFKE et al., 2012) e o extrato aquoso das folhas mostraram atividade antiviral para o herpesvírus (PADILLA, et al., 2018).

Na *C. adamantium* foi testada a atividade antioxidante no óleo essencial (folhas) (COUTINHO et al., 2008) e em extratos hexânicos (frutos) por Cardoso et al. (2010). Coelho et al. (2023) testaram o infuso das folhas e todos os extratos demonstraram potente ação antioxidante. Pavan et al. (2009), usando o extrato de acetato de etila (frutos), verificaram a atividade anti-*Mycobacterium tuberculosis*. Cardoso et al. (2013) e Pascoal et al. (2014) verificaram a atividade antiproliferativa utilizando extratos de frutos e folhas e os mesmos apresentaram redução do índice mitótico. Também a atividade antihiperalgésica do extrato proveniente da casca dos frutos foi verificada e demonstrou efeito promissor (SOUZA et al., 2014).

Sobre a *C. guazumifolia* foram realizados estudos para verificar a atividade anti-inflamatória no extrato aquoso das folhas (CATELAN et al., 2018) e ansiolítica e antidepressiva no extrato hidroetanólico dos frutos (FERREIRA et al., 2013; SOUZA et al., 2017). No extrato diclorometano (polpa e casca dos frutos) foi demonstrada atividade antiproliferativa em células de melanoma (LIMA e SILVA et al., 2018). O extrato metanólico (frutos) reduziu a agregação plaquetária e a inibição da cicloxigenase (LESCANO et al., 2018). O extrato etanólico e o óleo essencial das folhas tiveram ação anti-inflamatória de acordo com Lorençoni et al. (2020). E, a espécie *C. Reitziana*, apresentou atividade anti-nociceptiva quando testado o extrato metanólico dos frutos (NESELLO et al., 2016). Biavati et al. (2004) estudando o extrato aquoso de *C. xanthocarpa* verificaram que o mesmo teve um efeito anti-hiperglicêmico significativo após quatro semanas de tratamento.

Diversos extratos a base de plantas medicinais exercem suas propriedades antilítogênicas alterando a composição iônica da urina, diminuindo a concentração de íons de cálcio ou aumentando a excreção de magnésio e magnésio e citrato. Essas substâncias também podem expressar atividade diurética ou conter saponinas que podem desagregar suspensões de mucoproteínas, que podem promover o processo de cristalização (AJEBLI et al., 2020; EMILIANI et al., 2021; MORENO et al., 2021). Da mesma forma, o uso de medicamentos para controle glicêmico são precursores de inúmeros efeitos colaterais adversos, resultando em uma demanda crescente por medidas seguras e pelo custo das mesmas (WIDYAWATI et al., 2019). (RASOULI et al., 2020). Biavati et al. (2004) estudando o extrato aquoso de *C. xanthocarpa* verificou que o mesmo não alterou significativamente os níveis lipídicos nos grupos tratados mas teve um efeito anti-hiperglicêmico significativo após quatro semanas de tratamento. Logo, o uso das plantas que apresentem fitoconstituintes que mostrem atividades anti-hiperglicêmica devem ser explorados e os mecanismos de controle glicêmico, elucidados (RASOULI et al., 2020). Até o momento não há relatos na literatura

sobre os efeitos biológicos (renais e anti-hiperglicêmicos) da *Campomanesia pubescens* (D.C.) O. Berg.

Alguns estudos com o gênero *Campomanesia*, apesar de não mostrarem sinais de toxicidade pré-clínica, (VISCARDI et al., 2017, AMARAL et al., 2019) apresentaram indicativos de genotoxicidade, demonstrado pela ocorrência de apoptose celular e mutagenicidade, pela presença de micronúcleos (MARTELLO et al., 2016) bem como alterações cromossômicas em células de *Allium cepa* (CATELAN et al, 2018).

As plantas continuam sendo uma importante fonte de compostos bioativos e envolvem uma abordagem multidisciplinar que combina técnicas etnobotânicas, fitoquímicas e biológicas para fornecer novos compostos químicos. Desta forma, a Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde, através da Política Nacional de Plantas Medicinas e Fitoterápicos (BRASIL, 2006), determina que os ensaios pré-clínicos são fundamentais para o desenvolvimento de fitoterápicos. A partir desses ensaios é possível avaliar os níveis de toxicidade e efeitos adversos associados ao consumo de qualquer substância (SILVA et al., 2012).

Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar a toxicidade pré-clínica, os efeitos diuréticos e anti-hiperglicemiante do infuso das folhas de *Campomanesia pubescens* em ratos Wistar, baseado nas normativas da *Food and Drugs Administration* (FDA), *Organisation for Economic Cooperation and Development* (OECD) e Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Família Myrtaceae

A família Myrtaceae possui grande valor econômico visto que seus frutos são normalmente consumidos *in natura* ou na forma de sumos, licores, gelados, geleias compotas e este consumo aumenta quando os efeitos nutricionais e terapêuticos estão presentes. É uma das mais importantes relacionadas com espécies frutíferas e bem estabelecida como uma árvore frutífera (LORENZI, 2008). Com 130 gêneros e cerca de 5.800 espécies distribuídas nas zonas tropicais e subtropicais do Hemisfério Sul. No Brasil, abrange mais de 100 espécies de fruta nativa de Norte a Sul do país (GIACOMETTI, 1992; DONADIO, 1992; MATTOS, 1992), entre arbustos e árvores a Myrtaceae é considerada uma das maiores famílias da flora brasileira. Apresentam folhas simples com glândulas oleíferas, flores polistêmones, ovário mediano a ínfero, floema interno e ornamentos através de pontuações que seguem nos vasos do xilema (GOMES et al., 2009).

A grande procura pelos frutos de Myrtaceae está relacionada geralmente à composição química, potencial terapêutico e nutricional da família, o que influencia diretamente nas questões econômicas relacionadas ao consumo e possibilidades de comercialização (KUSKOSKI et al., 2006; ROCHA; MORAIS; CHANG, 2011).

As espécies do gênero *Campomanesia*, pertencentes à Myrtaceae, são amplamente encontradas na região central do Brasil, no Uruguai, Paraguai e Argentina. No Mato Grosso do Sul a *C. adamantium* é muito utilizada *in natura* e na forma de doces, sorvetes, refrescos, licores e, muitas vezes, como flavorizantes em destilados alcoólicos (VALLILO et al., 2008).

Entre as Myrtaceae brasileiras há espécies de importância medicinal cujas atividades biológicas incluem: efeito antioxidante (*Eugenia caryophyllata*, *Eugenia involucrata*, *C. pubescens*, *Campomanesia xanthocarpa*, *Psidium cattleianum*) (CARDOSO et al., 2008; MARIN et al., 2008; MADALOSSO et al., 2011; ROCHA; MORAIS; CHANG, 2011; atividade, antimicrobiana (*Eugenia jambolana*, *Syzygium aromaticum*) (JASMINE et al., 2010; MACHADO, 2010); efeito hipoglicemiante (*Campomanesia xanthocarpa*, *Eugenia jambolana*) (BIAVATTI et al., 2004; KUMAR et al., 2010); atividade anti-inflamatória e antinociceptiva (*Eugenia discifera*, *Eugenia candolleana*) (MARIDASS, 2008; GUIMARÃES et al., 2009); atividade imunomodulatória (*Campomanesia pubescens*, *Syzygium aromaticum*) (CARRASCO, 2009; GUERRERO et al., 2010) e hepatoprotetora (*Eugenia jambolana*) (SISODIA e BHATNAGAR, 2009).

Tabela 1. Classificação taxonômica da espécie *Campomanesia pubescens*.

Classe	Magnoliopsida
Ordem	Myrtales
Família	Myrtaceae
Gênero	<i>Campomanesia</i>
Espécie	<i>Campomanesia pubescens</i> O. Berg.

Fonte: Autora (2023).

2.2 O gênero *Campomanesia* e a espécie *Campomanesia pubescens*

O interesse nas plantas está sempre circundando os aspectos de sua composição química pois desta forma se determinam muitas bioatividades.

O gênero *Campomanesia* (Myrtaceae) é típico do Cerrado e tem sido estudado por vários autores devido suas propriedades anti-inflamatórias (SILVA et al., 2016a) e antioxidantes (ABE et al., 2014), potencial inseticida (antibiose com insetos), substâncias químicas, tais como flavonoides, taninos e saponinas que são alvos de interesse em produtos naturais (MARKMAN, 2002). Contendo cerca de 45 táxons o gênero *Campomanesia* se encontra distribuído predominantemente em áreas de florestas tropicais e vegetação de savana (LANDRUM, 1986; GOVAERTS et al. 2008). Na flora brasileira são conhecidas 39 espécies. Dessas, 29 são consideradas endêmicas (SOBRAL et al, 2015).

Os frutos das *Campomanesias*, símbolo de Mato Grosso do Sul conforme Lei n. 5.082 de 11/07/2017 (SANTOS et al, 2019), possuem grande importância para o equilíbrio da fauna, por ser consumida por um grande número de pássaros, pequenos mamíferos, peixes e répteis. Entre os meses de agosto e dezembro ocorre a floração e maturação dos frutos. O gênero possui frutos arredondados, sua coloração tem uma variação de verde-escuro/claro até amarelo e têm aroma adocicado e agradável (VALLILO et al., 2006).

No Mato Grosso do Sul a *Campomanesia pubescens* é popularmente conhecida com guavira ou gabirola, sendo um arbusto que mede de 1 a 2 metros de altura (Figura 1). Com caule piloso, folhas oblongas, flores isoladas, brancas, sépalas agudas (PEIXOTO et al., 2005; LORENZI et al., 2006). Diferente das demais espécies arbustivas de gabirolas ela tem pedúnculos densamente pubescentes, mais alongados que o broto floral. Além disso, possuem folhas imaturas por ocasião da antese, ou seja, no momento da abertura dos botões florais, coriáceas quando maduras e pubescentes na face anterior (LORENZI; SOUZA, 2008).

Figura 1. Imagem ilustrativa da *Campomanesia pubescens*.



A: Folhas e **B:** Flores de *Campomanesia pubescens*.

Fonte: Imagens cedidas pelo Dr. Marcelo Kuhlmann.

Estudos demonstraram que as folhas da *Campomanesia pubescens* (D.C.) O. Berg (guavira) (Tabela 1), colhidas em áreas nativas de Mato Grosso do Sul (MS), apresentaram efeito anti-inflamatório devido à redução dos monócitos circulantes (GUERRERO et al., 2010) e efeito antioxidante frente ao método do β -caroteno/ácido linoleico (CARDOSO et al., 2008) e do 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH) (ROCHA; MORAIS; CHANG, 2011).

2.3 Composição química e atividades biológicas do gênero *Campomanesia*

As plantas são fontes vivas de imensa variedade de metabólitos secundários (NEWMAN e CREAGG, 2020), esses por sua vez formam a base de muitos medicamentos e fitoterápicos. Os diferentes constituintes químicos das plantas medicinais possuem atividades biológicas que podem melhorar a saúde humana (SANCHITA e SHARMA, 2018).

Diversas espécies têm importância significativa na utilização de partes (raiz, caule, folhas, flores, frutos e sementes) (YANQUN et al., 2020). Os metabólitos secundários são classificados de acordo com sua rota biossintética de diversos grupos químicos específicos (HODEK et al., 2002).

Nas diferentes espécies do gênero *Campomanesia*, os metabólicos comumente encontrados são as champanonas, os terpenos, os flavonoides, os taninos e as saponinas. Os flavonoides possuem propriedade antioxidante e farmacológicas e que tem sido alvo de interesse de muitos pesquisadores, devido as evidências de que essas substâncias afetam funções biológicas como a permeabilidade capilar, processos envolvidos na resposta inflamatória, atividade de enzimas, receptores ou carreadores (NOROOZI et al., 1998; MOTA et al., 2009).

As folhas e cascas do caule da *Campomanesia* possuem propriedades que ajudam no combate à diarreia, à febre e a doenças urinárias e diarreia (ALICE et al., 1995; (RODRIGUES; CARVALHO, 2001).

Demonstrou-se que o extrato hexânico teve alta atividade antioxidante, conforme o método β -caroteno/ácido linoleico (que reage com amostras não-polares) (CARDOSO et al., 2008) e baixa atividade antioxidante, pelo método do α -diphenyl- β -picrylhydrazyl (DPPH) (que reage com amostras polares). Os extratos etanólicos das folhas de *Campomanesia pubescens* apresentaram atividade antioxidante (CHANG et al., 2011) o que torna esta planta ainda mais promissora no âmbito da ciência farmacêutica.

Em teste de investigação química com extratos hexânico e acetato de etila dos frutos de *C. pubescens*, a avaliação da atividade antioxidante, os teores de substâncias fenólicas e a avaliação do efeito antiproliferativo foram promissores (CARDOSO et al., 2013).

Quadro 1 – Substâncias/classes químicas identificadas e/ou isoladas e atividades biológicas de espécies do gênero *Campomanesia*

Espécie	Substâncias identificadas e/ou isoladas	Material vegetal	Atividade biológica	Autor/ano
<i>Campomanesia eugenioides</i>	Flavonoides, triterpenos e taninos	Extrato aquoso das folhas	Atividade antimicrobiana	MOURA-COSTA et al., 2012.
<i>Campomanesia guazumifolia</i>	biciclogermacreno (15%), globulol (5%) e espatulenol (5%)	Óleo essencial da folha	Potencial antioxidante e antimicrobiano	SANTOS et al., 2019.

<i>Campomanesia guazumifolia</i>	Três flavonoides glicosilados e ciclo-hexanocarboxílico	Infusão de folhas	Anti-inflamatório, antiedematogénico, atividade antinociceptiva e baixa toxicidade.	CATELAN et al., 2018.
<i>Campomanesia xanthocarpa</i>	Cariofileno, α -Eudesmol, Guaiol, α -Selinene, β -cadinene	Extrato da semente (extração SCCO2)	Antidiabético e hipolipídico	REGGINATO et al., 2020.
<i>Campomanesia xanthocarpa</i>	β -cariofileno	Extrato da semente (extração SCCO2)	Anti-inflamatório	PETRY et al., 2021.
<i>Campomanesia xanthocarpa</i>	Flavonoides, saponinas e taninos.	Folhas	Efeitos anti-ulcerogênicos	MARKMAN et al., 2004.
<i>Campomanesia xanthocarpa</i>	β -cariofileno, γ -cadineno, acadinol, viridiflorol, α -gurjunene	Extrato de sementes (SCCO2)	Antidepressivo	ANZOLLIN et al., 2022.
<i>Campomanesia xanthocarpa</i>	Flavonoides glicosilados, proantocianidinas e flavano-3-ols	Extrato das folhas	Atividade hipotensiva	MORAIS et al., 2020.
<i>Campomanesia xanthocarpa</i>	Hidrocarbonetos sesquiterpeno	Óleo essencial da folha	Anti-leishmaniose	FERREIRA et al., 2021.
<i>Campomanesia xanthocarpa</i>	Flavonoides, saponinas e taninos	Extrato do fruto	Atividade antiadiarreica e antibiótica	SOUZA-MOREIRA et al., 2011.
<i>Campomanesia lineatifolia</i> Ruiz e Pav.	Flavonoides, taninos, Catequina e quercitrina	Extrato etanólico das folhas	Agente gastroprotetor e efeito antiulcerogênico	MADALOSSO et al., 2012.
<i>Campomanesia phaea</i>	Derivados do ácido gálico, derivados do ácido elágico	Extrato polifenólico	Ações terapêuticas atenuando a resistência à insulina e a esteatose hepática	DONADO-PESTANA et al., 2020.
<i>Campomanesia</i>	Óxido de	Extração dos	Ação no sistema	WCZASSEK

<i>phaea</i>	cariofileno, beta-cariofileno, beta-selineno e alfa-cadinol	frutos com água/etanol	nervoso central: <i>grooming</i> e atividade cardiovascular	et al., 2019.
<i>Campomanesia reitziana</i>	Dimetil-cardamonina	Extrato metanólico dos frutos	Efeitos antinociceptivos	NESELLO et al., 2020.
<i>Campomanesia reitziana</i> D. Legrand	Chalconas, dimetil cardamonina	Fruto	Gastroprotetora	CURY et al., 2022.
<i>Campomanesia velutina</i>	Flavonoides, taninos e compostos fenólicos	Extrato aquoso das folhas	Potencial tóxico agudo e subagudo para o sistema hematopoiético	ARAÚJO et al., 2017.
<i>Campomanesia adamantium</i>	Flavonoides isolados	Extrato aquoso e extrato etil-acetato de folhas	Anti-inflamatória e antinociceptivo	FERREIRA et al., 2013.
<i>Campomanesia adamantium</i>	Casca: limoneno, thujopseno β -pineno Polpa: flavononas e chalconas	Casca e polpa microencapsulada	Anti-inflamatória e antidepressiva	VISCARDI, 2017
<i>Campomanesia adamantium</i>	Chalconas, flavonoides e compostos fenólicos	Extrato hidroetanólico das folhas	Atividades mutagênicas antimutagênica, fagocitárias esplênicas, e apoptóticas	MARTELLO et al., 2016.
<i>Campomanesia adamantium</i>	Ácidos gálico e elágico	Extrato aquoso da raiz	Efeitos antioxidantes e anti-hiperlipidêmicos	DE TOLEDO ESPINDOLA et al., 2016.
<i>Campomanesia aurea</i>	p-cimeno (8,33%), α -cadinol (10,72%), Terpinoleno (3,43%)	Óleo essencial das folhas	Efeito bacteriostático e atividade antibiofilme	PACHECO et al., 2020.

<i>Campomanesia pubescens</i>	Chalconas	Frutos inteiros e frescos	Atividades antiproliferativa e baixa atividade antioxidante	CARDOSO et al., 2013.
<i>Campomanesia pubescens</i>	Flavonoides e compostos polifenólicos	Extrato etanólico dos frutos	Efeito antidepressivo e ansiolítico do SNC	VILLAS BOAS et al., 2020.

Fonte: A autora (2023).

2.3.1 Composição química do chá de *Campomanesia pubescens*

As folhas de *Campomanesia pubescens* foram coletadas em Dourados-MS. A exsicata está depositada no Herbário da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), sob o número 839. A coleta foi registrada no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e Conhecimentos Tradicionais Associados do governo brasileiro sob código A055721.

As folhas foram secas em estufa de circulação de ar a $37 \pm 2^\circ\text{C}$, e moídas em moinho tipo Willey (Marconi) com uma peneira de malha 10. Logo depois, as mesmas foram armazenadas, identificadas para posterior preparo do infuso. A infusão das folhas das foi obtida pelo método descrito por Catelan et al. (2018), em que folhas na proporção de 20 g/L permaneceram em contato com água previamente aquecida a $95\text{--}100^\circ\text{C}$, por 20 min em um recipiente fechado e depois mais 10 minutos com recipiente aberto. Após o término do período de contato, a infusão das folhas foi filtrada, liofilizada (Alpha 1–2LD Plus, equipamento Christ e parâmetros de vácuo de 0,045 mbr e temperatura de -42°C) e armazenada em frasco hermeticamente fechado e mantido à temperatura de -20°C . O rendimento foi calculado pela razão entre a planta seca e o extrato liofilizado.

A amostra de extrato foi preparada na concentração de 1 mg/mL para os testes de compostos fenólicos, flavonoides, taninos e saponinas. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

2.3.1.1 Cromatografia Líquida de Alto Desempenho (HPLC)

A análise foi realizada em um Cromatógrafo Líquido de Alto Desempenho Prominence® HPLC Shimadzu com detector com arranjo de diodo SPD-M20A. A coluna utilizada foi Shim-pack XR-ODS (2 mm x 75 mm) com partículas de $2,2\ \mu\text{m}$ da Shimadzu.

Foi empregado um sistema binário durante a análise (Tabela 2), com água com 0,1% de ácido fórmico como solvente A e acetonitrila como solvente B. Foi realizado o monitoramento do detector entre os comprimentos de onda de 200 e 800 nm.

Tabela 2 – Proporção de solvente durante a análise cromatográfica

Tempo	Solvente B
0 – 3 min	5 – 12%
3 – 7 min	12 – 13%
7 – 7,5 min	13 – 35%
7,5 – 9 min	35 – 50%
9 – 16 min	50 – 90%
16 – 18 min	90 – 5%
18 – 19 min	5%

Fonte: A autora, 2023.

As amostras foram preparadas na concentração de 1 mg mL⁻¹ e foi injetado 1 µL em triplicata.

2.3.1.2 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos seguiram a metodologia de Folin-Ciocalteu (DJERIDANE *et al.*, 2006), método colorimétrico, onde foram adicionados 1,5 mL de carbonato de sódio 20%, 0,5 mL do reagente de *Follin-Ciocalteu* (1:10 v/v) e 1 mL de água em 100 µL de amostra. Aguardou-se reação por 30 minutos e fez-se leitura em comprimento de onda de 760 nm. O resultado foi expresso em mg de ácido gálico equivalente por g de extrato (mg AGE g⁻¹).

2.3.1.3 Flavonoides

Utilizando o método descrito por Djeridane et al. (2006) foi feita determinação dos flavonoides, onde foram adicionados 1000 µL de cloreto de alumínio 2% (AlCl₃. 6H₂O) em metanol em cada 1000 µL de cada amostra; depois de 15 minutos de reação, foi realizada a leitura em comprimento de onda de 430 nm. A concentração de flavonoides foi calculada por meio de uma curva analítica utilizando a rutina como padrão em concentrações de 1 até 50 µg mL⁻¹. O resultado foi expresso em mg de rutina por g de extrato liofilizado (mg REg⁻¹).

2.3.1.4 Taninos

Os teores de taninos foram determinados pelo método de Folin-Denis conforme descrito por Pansera et al. (2003) com adaptações. A reação durou cerca de 120 minutos, foi adicionado 500 μL de reagente Folin-Denis em seguida 500 μL de carbonato de sódio 8% (m/v) a cada 500 μL de amostra. A leitura foi realizada em comprimento de onda de 725 nm. A concentração de taninos foi calculada utilizando padrão de ácido tânico e expresso em mg de equivalente de ácido tânico (TAE) por g de extrato liofilizado.

2.3.1.5 Saponinas

Foram determinadas pela formação do favo de mel da espuma resultante agitação de 5 mL de um extrato aquoso da amostra e a adição de bicarbonato de sódio e persistência da mesma por mais de 3 minutos (GUTERRES et al, 2022).

2.3.1.6 Atividade Antioxidante pelo método DPPH

A atividade antioxidante foi avaliada pelo método descrito por Kumaran e Joel Karunakaran (2006). O extrato foi analisado nas concentrações 1, 10, 100, 500, 1000 $\mu\text{g/mL}$. A solução de DPPH 0,004% em metanol (3000 μL) foi adicionada a cada 100 μL amostra. As amostras foram feitas em triplicata e lidas em comprimento de onda de 517 nm, 30 minutos após a reação. Os resultados obtidos foram expressos em concentração inibitória mínima (CI_{50}) indicando a concentração para inibir 50% do radical DPPH.

2.3.1.7 Análise do potencial fotoprotetor

Para determinar o potencial fotoprotetor, o extrato ($200 \mu\text{g mL}^{-1}$) foi preparado e as leituras foram realizadas em espectrofotômetro UV/sVis entre 290 e 320 nm, com intervalo de 5 nm. Água destilada foi utilizada como branco e as absorbâncias obtidas foram substituídas na Equação conforme descrito por Mansur et al. (1986).

2.3.1.8 Avaliação da atividade antibacteriana

A amostra foi analisada nas concentrações de 15-1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Os ensaios para determinar o potencial antibacteriano foram realizados obedecendo-se à metodologia descrita por Bernardi et al. (2017). A atividade antibacteriana foi testada contra cepas de bactérias das espécies *Burkholderia cepacia* (NEWP 0059), *Enterococcus faecalis* (ATCC29212), *Escherichia coli* (ATCC 38731), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC27853), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC12228), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25232) e *Staphylococcus saprophyticus* (ATCC15305). Utilizou-se a tetraciclina (15 $\mu\text{g mL}^{-1}$) como controle positivo. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

2.4 Ensaio de toxicidade *in vivo*

A regulamentação para o registro de medicamentos fitoterápicos está em conformidade com a Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) 48/2004, que descreve e determina os aspectos essenciais ao registro (identificação botânica, padrão de qualidade, eficácia e segurança) que validem as indicações terapêuticas propostas (COELHO et al., 2022). Há ainda as Resoluções Específicas como a RE 90/2004, contendo o Guia para realização dos testes de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos.

A ANVISA elaborou um guia de conduções de estudos pré-clínicos onde estes são descritos com direcionamento para a avaliação e identificação de possíveis efeitos adversos com associação a toxicologia das substâncias e sua interação com os sistemas fisiológicos ou órgão-alvo. Caracterizando também a relação dose-resposta, efeitos agudo, subagudo e crônico, e a reversibilidade dos efeitos tóxicos no organismo (OECD, 2008a, 2008b; CANTATORE, et al, 2022).

Toxicidade é definida como a propriedade potencial de uma determinada substância de gerar um estado patológico em consequência de sua inserção ou interação com o organismo (BANDARANAYAKE, 2006; NEWMAN et al, 2007). A toxicidade, no contexto do uso de produtos naturais pode ser considerada um problema de saúde pública, pois o aumento de casos de intoxicação cada vez mais têm sido relatados envolvendo o uso de plantas (SILVEIRA et al., 2008; EKOR, 2013).

Alergias em pele e mucosas, distúrbios cardiovasculares, respiratórios, metabólicos, gastrintestinais, neurológicos e, em alguns casos, o óbito são reações adversas comumente encontradas em efeitos tóxicos de plantas (SINITOX, 2012; VASCONCELOS et al., 2021).

Sendo assim, as investigações são de suma importância para o controle dessas ocorrências de intoxicação e os Centros de Informação e Assistência Toxicológica (CATs) são responsáveis pelo registro das ocorrências de intoxicação (SINITOX, 2012). Segundo Monseny (2015), as intoxicações humanas fatais são raras e as notificações totais serem baixas ainda se faz necessário cautela e mais estudos sobre o uso de plantas medicinais, visto que muitos casos são notificados como exposição a agente tóxico desconhecido.

2.4.1 Teste de toxicidade com *Artemia salina*

De acordo com metodologia adaptada de Meyer (1982) ovos de *Artemia salina* foram colocados para eclodir em uma solução salina de sal marinho (30 g L⁻¹) com pH entre 8,0 a 9,0 com solução 0,1 mol L⁻¹ de NaOH. com aeração por 48 horas em temperatura ambiente. Foram transferidos 10 náuplios para tubos com diferentes concentrações (10, 100, 1000, 2000 mg/mL) do chá de *C. pubescens* Na solução inicial, foi utilizado um controle para realizar a contagem do náuplios para estimar a DL₅₀ realizada após 24 horas.

2.4.2 Toxicidade aguda

Os testes relacionados à toxicidade são fundamentais pois fornecem informações referentes às reações adversas ou efeitos adversos que possam acontecer no organismo humano após o uso de uma planta medicinal ou fármaco. A toxicidade aguda refere-se à exposição a curto prazo a um composto químico, seja por via dérmica, oral ou inalatória (OECD, 2008a). A maioria das informações sobre a via mais comum de toxicidade remetem à via oral (forma grave), sendo que a mesma ocorre de forma acidental em diversas situações e ambientes por meio ingestões após respingos inesperados ou liberação repentina, consumo de produtos químicos presentes nos alimentos, bebidas ou outros produtos (CRETON et al., 2010; FALCÃO et al., 2022).

Neste tipo de ensaio devem ser consideradas todas as informações possíveis relacionadas à planta/substância utilizada. O intuito é obter mais informações de suas estruturas químicas, atividades biológicas, propriedades e testes que por ventura já tenham sido feitos *in vivo* ou *in vitro*. Tais informações determinam a relevância das substâncias analisadas e sua utilidade para saúde do ser humano. A prioridade do teste é determinar a dose inicial adequada para uso (OECD, 2008a; DORNELES, 2022).

A dose letal média (DL50) é identificada por meio da toxicidade oral aguda. A DL50 é estimada pela capacidade de induzir a morte de metade dos animais do grupo teste. Esta determinação acontece após uma única dose dentro de um período de 24 horas, que fornece estimativa que permite classificar a substância teste quanto a seus efeitos (SOARES e SOUZA, 2022). Com a intenção de diminuir o uso de animais, um novo *guideline* foi estabelecida no ano de 1981, sob o número 401. Em 1987, a diretriz propôs um delineamento experimental de três grupos compostos por cinco (5) animais de cada sexo, usando dose acima de 5000 mg/kg. No mesmo ano, uma nova alteração permitiu utilizar apenas um sexo e também a redução da dose para 2000 mg/kg, com exceções para teste que haja informações precedentes e haja necessidade de doses maiores (CRETON et al., 2010; EL MOUSSAOUI et al., 2020).

Baseado na diretriz 425 “*Acute oral toxicity – Up and down procedure*” da OECD (OECD, 2008a), com adaptações descritas por Traesel et al. (2017), sendo dois grupos experimentais: 1) Grupo controle (1 mL água v.o), e 2) Grupo tratado (2000 mg/kg v.o). A via de administração é escolhida de acordo com a indicação popular de uso.

Na ingestão de infusos de modo geral opta-se pela via oral, levando em consideração que a população faz o uso por meio da via oral. Com uso de agulha de gavagem é realizado o tratamento dos animais.

A determinação do modelo animal segue as normativas estabelecidas na diretriz 425 pela OECD (OECD, 2008a), em que se utiliza *Rattus norvegicus* da linhagem *Wistar*, sendo possível também utilizar outros tipos de roedores sendo preferencialmente o delineamento com fêmeas, nulíparas, não prenhes aproximadamente com idade de 8 a 12 semanas.

A dose de 2000 mg/kg é estipulada quando há estudos prévios ou outro tipo de informação relacionada à toxicidade realizada com a espécie de planta em estudo. Após essa delimitação, a um animal por vez, é administrada a dose selecionada de acordo com o protocolo, que consiste da observação do primeiro animal a receber a dose (observando sinais de toxicidade), e em sequência os demais animais (quatro) também recebem respectivas doses. A observação segue a fim de identificar sinais de toxicidade e estimar a DL₅₀.

Nos casos onde não há informações ou estudos relacionados à toxicidade *in vitro* ou *in vivo* com as espécies e a parte da mesma utilizada, as recomendações são que se aplique o fator de progressão 3,2 na sequência de (1,75; 5,5; 17,5; 55; 175; 550; 1750 mg/kg), assim a dose recomendada para iniciar é 175 mg/kg (OECD, 2008a). Após a primeira dose administrada com a sobrevivência do animal, observa-se o mesmo durante 24h. Não apresentando sinais de toxicidade, administra-se uma dose maior seguindo o fator de

progressão. Se, no entanto, acontecer óbito na primeira administração (primeiro animal), a próxima dose deve ser inferior, baseando-se assim nos sinais clínicos observados. A observação então de sinais clínicos e os animais quando o óbito não acontece entende-se que a estimativa de DL_{50} é acima da dose administrada, e então esses animais permanecem em observação por mais 14 dias do estudo.

Durante estes 14 dias são observados e registrados sinais clínicos e tóxicos baseados nos cinco parâmetros do *screening hipocrático* conforme descrição de Malone; Robichau, (1962). Ainda são anotados consumo hídrico e alimentar, pelo método de registro diário do peso da ração e do volume final da água disponível em cada gaiola e também o peso de cada animal. No 15º dia de experimentação todos os animais do grupo controle e grupo tratado foram submetidos a eutanásia e autópsia macroscópica (ANVISA, 2013).

Todos os sinais clínicos devem ser sistematicamente anotados, levando-se em conta os cinco parâmetros do *screening hipocrático* (MALONE; ROBICHAU, 1962), descritos a seguir:

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

Além da observação dos 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).

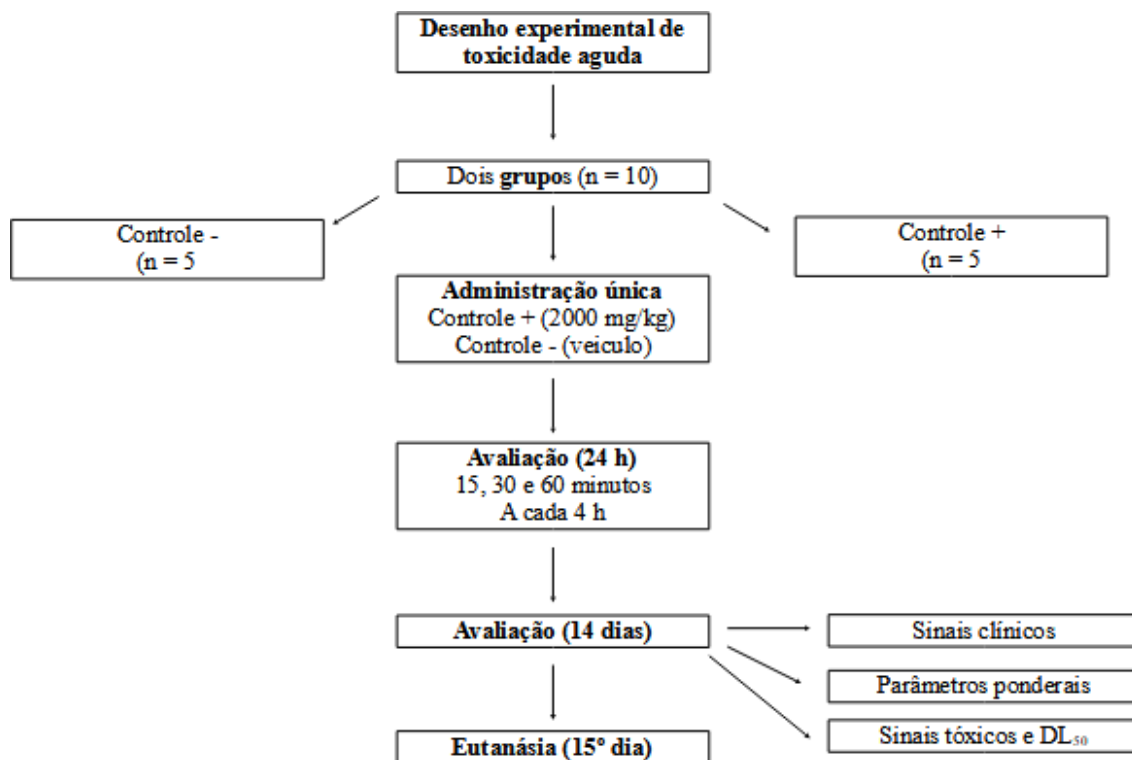
2.4.2.1 Desenho experimental de toxicidade aguda

Os animais foram cedidos pelo Biotério da UFGD e mantidos no biotério da Faculdade de Ciências da Saúde (FCS), da UFGD em caixas de polipropileno, em temperatura controlada ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), ciclo escuro/claro de 12 h e livre demanda de água e comida. Os procedimentos experimentais seguiram as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação

Animal e de acordo com as diretrizes da Declaração Universal dos Direitos dos Animais com os Princípios Éticos em Pesquisa Animal e aprovado pelo Comitê de Ética para Uso de Animais da UFGD (Protocolo nº 78/2021).

A pesquisa foi feita de acordo com o protocolo baseado nas Diretrizes 425 da OECD: *Oral Acute Toxicity - Up-and-Down Procedure* (OECD, 2008) com adaptação de Traesel et al. (2017). Dez ratas foram alocadas aleatoriamente em dois grupos experimentais (n=5): 1) grupo controle negativo recebeu tratamento oral com solução veículo e 2) grupo teste administrado por gavagem a dose de 2000 mg/kg de Inf-L-CP. Antes da gavagem, cada animal foi identificado, pesado e avaliados seus sinais clínicos. Os animais foram observados nas primeiras 24 h; posteriormente, foram observados uma vez ao dia, durante 14 dias, com registro diário da ingesta hídrica e nutricional e ganho ponderal de cada animal. Os animais ainda foram analisados de acordo com a triagem hipocrática proposta por Malone e Robichaud (1962): estado consciente; atividade e coordenação do sistema motor e tonificação muscular; reflexos corneanos e auriculares; atividades do sistema nervoso central e atividades do sistema nervoso autônomo. A eutanásia ocorreu no dia 15 após as avaliações e os animais foram submetidos à eutanásia com overdose de anestésicos até que não houvesse reflexo corneano seguido de exsanguinização. Órgãos (coração, pulmão, baço, fígado, rim, útero e ovário) foram removidos, pesados e examinados macroscopicamente para quaisquer alterações e enviados para análise microscópica tecidual. Com este teste pode-se estimar a dose letal mediana (DL₅₀) (Figura 2).

Figura 2. Desenho experimental de toxicidade aguda.



Fonte: A autora, 2023.

2.4.3 Toxicidade subaguda

A determinação da toxicidade oral por doses repetidas a curto prazo acontece após a determinação de informações iniciais obtidas nos testes de toxicidade aguda. A toxicidade subaguda investiga os possíveis sinais de toxicidade, fornecendo também informações relevantes sobre os possíveis riscos para a saúde que possam surgir durante ou após um período de exposição a doses repetidas e seus possíveis efeitos sobre os sistemas do corpo humano (ANVISA, 2013; OECD, 2008b).

Os estudos de toxicidade oral de doses repetidas vêm sendo empregados para descrever o potencial que uma determinada substância possui de causar algum dano. Estuda-se então a dose, as mudanças fisiológicas e hemodinâmicas, as alterações bioquímicas, as hematológicas e histopatológicas que, por meio delas, é possível então determinar o potencial toxicológico do composto/substância testada. Este estudo em 28 dias pode fornecer informações sobre a exposição de doses repetidas e, por consequência, indicar se novos estudos serão necessários a longo prazo, bem como, estudos de toxicidade crônica. Por fim, o

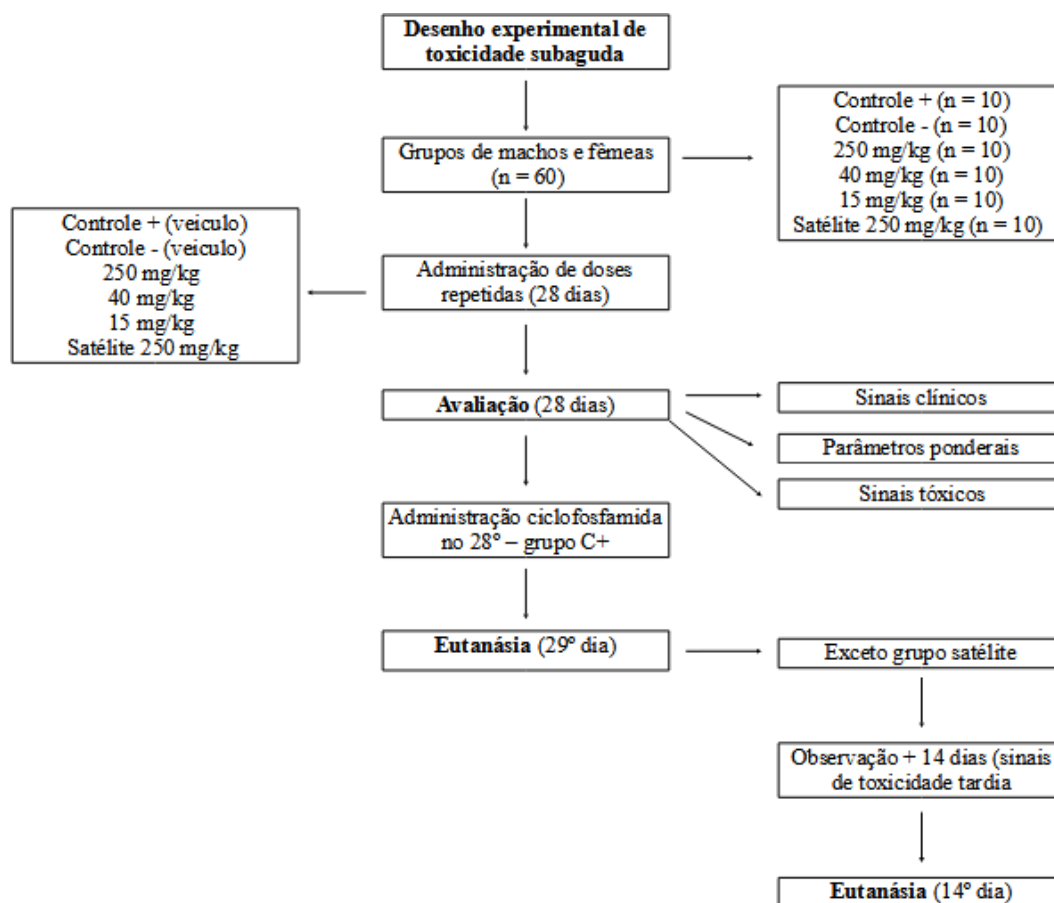
estudo deve permitir: a caracterização da toxicidade da substância de teste, a indicação da relação dose-resposta e a determinação da Dose de Efeitos Adversos Não Observáveis ou dose NOAEL (do inglês, *No-Observed Adverse Effect Level*) (OECD, 2008b).

Existem muitas regras para realizar um estudo de toxicidade, principalmente quando se está prospectando um novo medicamento, em geral, usam-se doses muito maiores do que a esperada para uso humano onde ocorre a hormese (resposta à exposição à quantidade crescente de uma substância) e, esses por sua vez, não substituem o modo de uso tradicional. Não obstante, ao se estabelecer a NOAEL é possível ter um melhor entendimento sobre os possíveis riscos (QUEIROZ et al., 2013). Mesmo quando não há uma significância estatística isso não indica por si só que não há de fato efeitos adversos para a determinação da NOAEL podendo-se então realizar uma análise combinada dos efeitos biológicos e estatísticos (ENGELHARDT, 2005).

2.4.3.1 Desenho experimental de toxicidade subaguda

Setenta animais foram randomizados em cinco grupos (n=5 fêmeas e n=5 machos). Foram utilizados dois grupos controles, sendo que no controle negativo, os animais receberam água (veículo Inf-L-CP) por gavagem (administração oral de 2 mL/100g de peso corporal). Simultaneamente, o controle positivo foi tratado por gavagem com água (veículo Inf-L-CP) e recebeu ciclofosfamida intraperitonal na concentração de 20 mg/kg de peso corporal 24 h antes da eutanásia (ARALDI *et al.*, 2014; KRISHNA; HAYASHI, 2000; RIBEIRO, 2003). Três grupos receberam Inf-L-CP oral em doses de 250 mg/kg; 40 mg/kg e 15 mg/kg por 28 dias consecutivos (Figura 3).

Figura 3. Desenho experimental de toxicidade aguda até a eutanásia.



Fonte: A autora, 2023.

2.4.4 Toxicogenética

A genética toxicológica abrange uma área de estudo da toxicologia que realiza diversas avaliações de efeitos genotóxicos produzidos por agentes, sejam eles físicos ou químicos, seja por uma exposição aguda ou subaguda, que por sua vez possa resultar em possíveis danos às moléculas de ácido desoxirribonucleico (DNA). A geração de danos no DNA é considerada como um evento inicial importante na carcinogênese. Existe uma bateria considerável de ensaios para a detecção de diferentes efeitos genotóxicos de compostos em sistemas experimentais, ou para investigações de exposição a agentes genotóxicos em ambientes ou ocupacionais. Alguns dos ensaios podem ter uma utilização limitada devido a uma configuração técnica complicada ou porque são aplicáveis apenas a alguns tipos de células. (DE LIMA et al., 2016).

Os ensaios de genotoxicidade são normalmente utilizados para identificar extratos/substâncias que têm a capacidade de interagir com ácidos nucleicos em baixas concentrações. Quando um agente tóxico interage com o DNA, esta interação pode levar a alterações cromossômicas e/ou alterações na estrutura do DNA que podem afetar a fidelidade da mensagem e levar a alterações irreversíveis na célula. As consequências de tal deficiência de DNA podem ser o estabelecimento e/ou predisposição para doenças, aumento da morbidade/mortalidade, alterações nas características hereditárias e diminuição da capacidade reprodutiva (LÁZARO et al., 2010).

Os eventos adversos associados aos medicamentos continuam a ser um problema significativo, apesar dos extensos e bem regulamentados processos de registo para provar a eficácia e a segurança dos medicamentos. As reações adversas aos medicamentos (RAM) são comuns e uma causa significativa de morbidade e mortalidade (QUEIROZ et al., 2013).

A avaliação de genotoxicidade isolada de demais ensaios não é recomendada pois demais fatores devem ser analisados como carcinogenicidade e efeitos mutagênicos, diante então dos resultados obtidos dão suporte para possível uso de substâncias naturais ou sintéticas (RIBEIRO, 2003). As substâncias derivadas de plantas ou não que promovem lesões estruturais ou funcionais quando têm interação com DNA e podem causar mutações, levando em consideração que exposições por doses repetidas a longo prazo a agentes genotóxicos levam a maiores. Tais lesões podem ser quantificados por meio de teste *in vitro* e *in vivo* aumentam a exequibilidade de gênese de tumores (ANVISA, 2013; VILAS BOAS et al., 2018; OECD, 2016b).

Alterações na taxa de divisão celular e/ou na estrutura do DNA são prejudiciais para as células, o que pode interferir com processos vitais como a replicação do DNA e a transcrição de genes. Além disso, estas alterações podem também causar mutações genéticas e alterações cromossômicas que contribuem para o desenvolvimento do cancro e morte celular (HAYASHI et al., 1990; DE FLORA; FERGUSON, 2005; OSSANA et al., 2013).

As substâncias genotóxicas são classificadas como: agentes causadores de danos ao DNA (genotoxicidade); ou lesões gênicas e mutações gênicas (mutagenicidade); causadores de câncer (carcinogenicidade) e causadores de anomalias congênitas (teratogênese) (TRAESEL et al., 2017).

Por conseguinte, é extremamente importante avaliar a genotoxicidade durante a avaliação pré-clínica de extratos/substâncias de plantas, a fim de verificar o seu potencial mutagênico, tanto em termos de segurança como econômicos, uma vez que as plantas medicinais são amplamente utilizadas na medicina popular e como recurso para o

desenvolvimento de novos medicamentos (DI STASI et al., 2002, MELO-REIS et al., 2011). Por outro lado, estes testes podem também identificar os extratos de plantas que têm um efeito antagônico à genotoxicidade, tais como um efeito anti-genotóxico, antimutagênico e/ou anticancerígeno (IDAOMAR et al., 2002; FELÍCIO et al., 2011).

Os danos no DNA podem ser reparados por vários mecanismos de reparação, incluindo a reparação da excisão de base (BER, do inglês *Base Excision Repair*), reparação de excisão de nucleotídeos (NER do inglês *Nucleotide Excisions Repair*), recombinação homóloga e reparação de junção final não homóloga (NHEJ) (WOJEWÓDZKA et al., 2011; JUGAN et al., 2011; Li et al., 2011a). Existem mais duas vias envolvidas no reparo de lesões no DNA, são elas: reparo direto e reparo por incompatibilidade (MMR do inglês *Mismatch Repair*) (EKER et al., 2009; RAM et al., 2013).

2.4.5 Genotoxicidade

A genotoxicidade é uma preocupação crescente, pois pode determinar o início e progressão de anomalias celulares. Pode ser definida como alterações genéticas destrutivas envolvendo mutações genéticas, aberrações cromossômicas estruturais, e recombinação induzidas por genotoxinas (XIE et al., 2011; SHAH et al., 2012). Também conhecida como toxicidade genética, a genotoxicidade faz parte da toxicologia e tem por objetivo de verificar se a substância investigada possui capacidade de causar dano ao material genético capaz de ocasionar lesão gênica, mutação gênica ou alteração cromossômica (QUEIROZ et al., 2013; ANVISA, 2013).

As genotoxinas são agentes que podem danificar a sequência de DNA e a estrutura cromossômica por adição, eliminação, duplicação, formação de anéis, etc. São classificadas em três grupos com base nos seus efeitos: (a) carcinogênicos ou agentes causadores de cancro, (b) mutagênicos ou agentes causadores de mutação, e (c) teratogênicos ou agentes causadores de defeitos de nascença (MOHAMED et al., 2011).

É impossível registrar um novo medicamento sem realizar ensaios de genotoxicidade. Em 1984, o Ministério da Saúde e Bem-Estar (MHW) do Japão adotou o uso de ensaios de genotoxicidade para aprovar novos fármacos (RAMA et al., 2002). Além disso, a *Food and Drug Administration* (FDA) recomenda a realização de ensaios de genotoxicidade para todos os novos fármacos, antes de realizar ensaios clínicos e receber autorização de comercialização. As autoridades reguladoras na maioria dos países têm diretrizes específicas

para testar os candidatos a medicamentos tendo os ensaios de genotoxicidade como parte da avaliação de segurança (AMOABEDINY et al, 2009).

Nos últimos anos muitas plantas medicinais prospectadas para o uso humano têm sido avaliadas frente ao seu potencial genotóxico. De acordo com a literatura, 30% dessas mostraram genotoxicidade e esse alto índice reforça a importância desse tipo de avaliações em plantas e seus derivados de interesse medicinal (NATARAJAN, 1993; DE FLORA; IZZOTTI, 2007; SPONCHIADO et al., 2016; SAKS et al., 2017).

As mutações podem ser induzidas por duplicação, deleção ou inserção. O controle de substâncias é a melhor maneira de controlar os efeitos deletérios desses compostos com atividade antimutagênica/anticlastogênica, bem como, os compostos que diminuem ou inibem a mutagenicidade e desmutagênicas a partir do uso de plantas medicinais (SILVA et al., 2008).

2.4.5.1 Ensaio cometa

O ensaio cometa, ou eletroforese em gel de célula única (SCGE, do inglês *Single Cell Gel Electrophoresis*), é um método sensível de detecção de quebras na fita de DNA, amplamente utilizado em testes de genotoxicidade, biomonitoramento humano, ecogenotoxicologia e em pesquisas básicas sobre o mecanismo de dano e reparo da molécula de DNA (COLLINS, 2004). As vantagens do ensaio *in vivo* de cometas incluem a sua aplicabilidade a vários tecidos e/ou tipos de células especiais, a sua sensibilidade para detectar baixos níveis de danos de DNA, a sua exigência de um pequeno número de células por amostra, a facilidade geral de execução do ensaio, o pouco tempo necessário para completar um estudo e o seu custo relativamente baixo (TICE et al., 2000; HARTMANN et al., 2003).

Consiste em fazer passar uma corrente elétrica pelas células lisadas, embebidas em gel de agarose de baixo ponto de fusão, sobre lâminas para microscopia (BETTI et al., 1994). Com isso, o DNA fragmentado sai da célula lisada, formando um rastro semelhante a cauda de um cometa (AFANASIEVA et al., 2010). A técnica foi primeiramente descrita por Östling e Johanson (1984), que desenvolveram a metodologia de eletroforese do DNA em microgel. Eles utilizaram radiação para gerar danos no DNA de células de mamíferos e observaram que, a extensão da cauda de DNA liberada era proporcional a quantidade de radiação utilizada (FAIRBAIRN et al., 1995). A técnica foi então aprimorada por Singh et al. (1988), que atribuíram maior sensibilidade à técnica com a utilização de solução alcalina. De acordo com Singh et al. (1988), o ensaio cometa é um método rápido, sensível e relativamente simples

para medir danos no DNA. Essa técnica pode ser utilizada em uma vasta gama de organismos (humanos, animais, plantas), tanto em culturas *in vitro* com *in vivo*, desde que as amostras possam ser preparadas como suspensão de células únicas (NERI et al., 2015).

O método alcalino do cometa com pH maior que 10 permite então que haja a desnaturação do DNA, e também a detecção de sítios álcali lábeis, fazendo com ele seja bem-aceito devido ao seu amplo alcance na verificação de danos ao DNA (HARTMANN et al., 2003; COLLINS et al., 2014). Nesse caso, a desnaturação da molécula de DNA detecta quebras de fita simples e duplas, sítios álcali-lábeis, ligações cruzadas e sítios de reparação por excisões incompletas (KAPPEL, 2007).

Este estudo é baseado no protocolo “*In Vivo Mammalian Alkaline Comet Assay*” (OECD, 2014a). Para o teste recomenda-se que sejam utilizados animais adultos jovens e saudáveis, de ambos os sexos com grupos de cinco animais, contendo também grupos de controle positivo e controle negativo. Com tratamento de doses diárias deve ser desenvolvido por tempo suficiente que possa haver ação no tecido alvo, sendo o tempo mínimo de dois dias (HARTMANN et al., 2003). Também é possível verificar quebras que possam acontecer nas cadeias do DNA, e essas por sua vez podem ser vistas por meio da migração de segmentos do DNA aumentadas, o que resulta em células com imagens semelhantes a cometas (COLLINS, 2015; GODSCHALK et al., 2013).

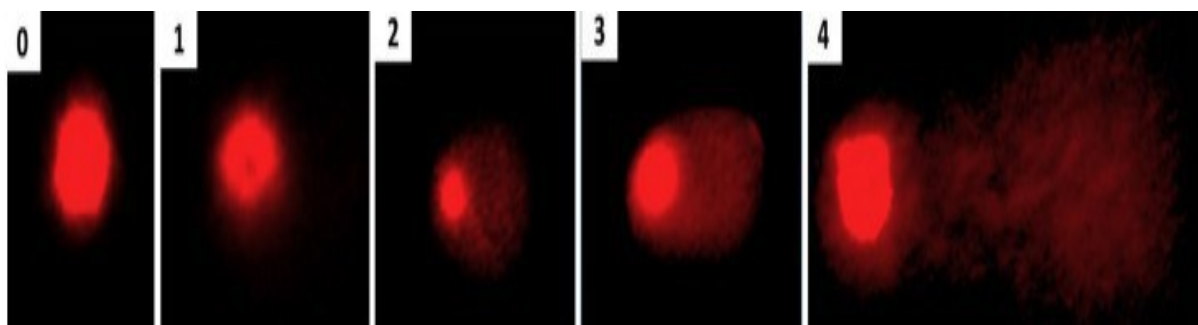
2.4.5.2 Delineamento experimental do ensaio cometa

Para análise de possíveis danos ao DNA provocados pelo infuso da *C. pubescens* em ratos, antes da eutanásia, 20 µL de sangue periférico foram coletados da cauda de cada animal e transferidos para microtubo *eppendorf* contendo 120 µL de agarose de baixo ponto de fusão (1,5%) a 37° C. Este homogenato foi depositado em lâminas previamente revestidas com agarose (5%). Após a solidificação da agarose, as lamínulas foram removidas e as lâminas foram inseridas na cuba com solução de lise final (89,0ml solução estoque - 2,5M NaCl, 100mM EDTA, 10,0mM Tris, pH 10,0 corrigido com NaOH sólido; 1,0ml Triton X-100 e 10,0ml de DMSO) por 1 hora, à temperatura de 4°C, por 2 h protegido da luz para remoção da membrana celular e extravasamento de DNA. Posteriormente ao processo de desnaturação, as lâminas foram imersas em equipamento de eletroforese com solução alcalina pH>13,0 (300,0 mM NaOH e 1 mM EDTA, preparada a partir de solução estoque de 10 N NaOH e 200 mM EDTA 200,0, com pH corrigido para 10), permanecendo em descansar por 20 min. Após o repouso, foram submetidos à corrida eletroforética por 20 min a 4°C e voltagem ajustada em

300 mA e 25 V. As lâminas foram expostas à solução de neutralização com pH 7,0 (400 mM Tris-HCl) por 15 minutos cada, lavadas e secas à temperatura ambiente. Foram fixadas em solução (ácido acético 15%, sulfato de zinco 5% e glicerol 5%) logo depois, coradas com nitrato de prata (MUELLER et al., 2018). Em seguida, as lâminas foram lavadas com água destilada e submersas por 5 minutos em ácido acético. A visualização dos fragmentos de DNA e os mesmos foram analisados com microscópio óptico com aumento de 400x.

As lâminas foram identificadas e examinadas em duplo cego, sendo que 100 células por animal foram analisadas aleatoriamente. As células foram classificadas da seguinte forma: 0 a 4, em que 0 representam células sem dano ao DNA e 4 células com o dano máximo (ARALDI et al., 2015) classe 0 (sem danos); classe 1 (células com tamanho de cauda menor que o diâmetro do nucleóide); classe 2 (células com tamanho de cauda 1-2 vezes o diâmetro do nucleóide); e classe 3 (células com tamanho de cauda maior que duas vezes o diâmetro do nucleóide). Além disso, foram calculados o escore de dano e a frequência de cada amostra. A pontuação foi determinada multiplicando-se o número de células registradas em cada classe de dano pelo valor numérico da classe e somando todos os valores resultantes (Figura 4).

Figura 4. Dano ao DNA por meio do teste cometa.



Classificação de 0 a 4, em que 0 representam células sem dano ao DNA e 4 células com o dano máximo. Imagens de microscópio de fluorescência.

Fonte: ARALDI et al., 2015.

2.4.6 Mutação gênica e ensaio do micronúcleo

Para a detecção de agentes clastogênicos (que quebram cromossomos) e aneugênicos (que induzem aneuploidia ou segregação cromossômica anormal) o teste do micronúcleo é um ensaio biológico bem estabelecido âmbito da mutagenicidade amplamente aceito pelas agências internacionais de regulação (OECD, 2014b). Este teste é bem-aceito pelo fato de ser um importante biomarcador testado *in vivo* e *in vitro* em pesquisas que se queria saber os

danos citogenéticos causados por substâncias genotóxicas (ARALDI et al., 2013). Conhecido como corpúsculos de Howell-Jolly, que tem associação a fragmentos convergentes expulsos do núcleo das células nos estágios tardios da anáfase (KIRSCH-VOLDERS et al., 2003). Sua formação está relacionada a rupturas cromossômicas (clastogênese) ou bloqueio do aparelho mitótico (aneugênese) (SWAPAN; DEY, 2010).

A definição de micronúcleo é caracterizada pela perda de cromatina em consequência de dano cromossômico estrutural ou danos no aparelho mitótico (RIBEIRO et al., 2003). No processo de maturação celular, presente na medula o eritroblasto resulta em um eritrócito policromático. Sendo o núcleo da célula é repelido, porém se um micronúcleo tenha sido formado permanece na célula. Contudo, essa frequência em excesso de eritrócitos policromáticos com micronúcleo pode indicar dano cromossômico induzido (OECD, 2014b).

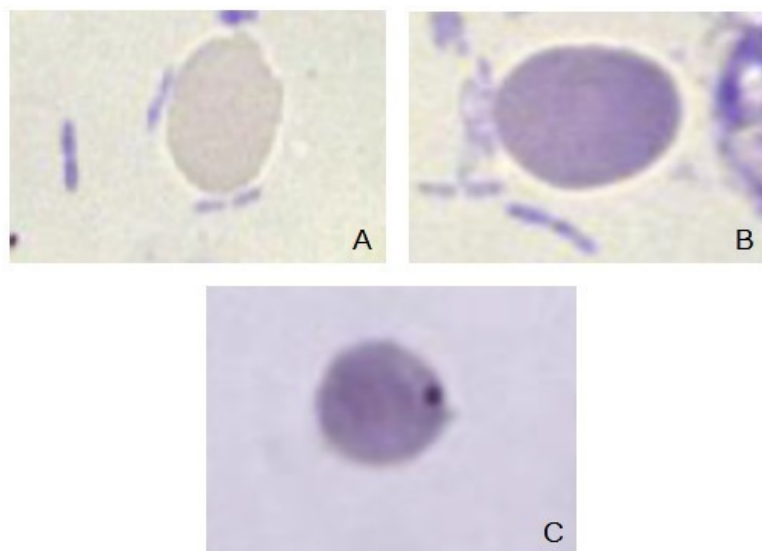
É possível determinar se a substância testada afeta geneticamente a formação de micronúcleos constituídos por material cromossômico da célula precursora por meio da indução a formação de micronúcleos através dos efeitos clastogênicos ou aneugênicos por meio da identificação de cinetocoros que tiveram um retardo na divisão celular, bem como, a presença de centrômeros específicos. (HAYASHI, 2000). Ao longo da eritropoiese, que acontece na medula óssea ou baço, os micronúcleos são formados, em geral, os eritroblastos perdem seu núcleo ao término da mitose o que por sua vez dá origem aos eritrócitos policromáticos (PCE - *Polychromatic Erythrocytes*), elas contêm RNA detectável no citoplasma através da coloração de Giemsa (KRISHNA; HAYASHI, 2000). Durante o processo de maturação dos PCEs origina-se os eritrócitos normocromáticos (NCEs, do inglês *Normochromic Erythrocytes*), que cora na cor rosa com a mesma coloração (Giemsa).

A clastogênese e/ou aneugênese são capazes de causar perdas cromossômicas inteiras durante a divisão celular ou uma fragmentação cromossômica. Uma frequência elevada de PCEs micronucleados (MNPCEs, do inglês *Micronucleated Polychromatic Erythrocytes*) indica danos cromossômicos (FENECH, 2000; KRISHNA; HAYASHI, 2000). Não obstante, não é apenas perdas cromossômicas, mas também mutações comumente observada no processo oncogênico (SHIMIZU, 2000; SWAPAN; DEY, 2010) por isso entende-se que formação do micronúcleo e sua liberação para o citoplasma está associada à carcinogênese (BONASSI et al., 2007; TERRADAS et al., 2010).

Portanto, o teste permite verificar os efeitos causados nos eritrócitos policromáticos anucleados. Também, se o eritrócito policromático apresenta micronúcleos, que é indicativo de dano cromossômico induzido recentemente, considerando que o mesmo possui um tempo

de vida curto e os micronúcleos são facilmente identificáveis e sua distribuição é bem definida (RIBEIRO et al., 2003) (Figura 5).

Figura 5. Células obtidas a partir do teste do micronúcleo *in vivo*.



Eritrócito normocromático (A), Eritrócito policromático (B) e Eritrócito policromático com micronúcleo (C). Imagens de eritrócitos visualizados na objetiva de 1000x. FONTE: ARALDI et al., 2015.

2.4.6.1 Delineamento experimental do ensaio do micronúcleo

O fêmur direito foi removido após dissecação dos músculos adjacentes para realização do ensaio de micronúcleo na medula óssea. Para expor a medula óssea, as duas extremidades do fêmur foram cortadas e o canal medular foi lavado com 1 mL de soro fetal bovino; a lavagem foi depositada em microtubos instantaneamente identificados com sequência alfanumérica e centrifugados por 5 min a 1000 rpm. O sobrenadante resultante foi descartado, o sedimento foi depositado na lâmina e seco durante a noite, posteriormente as lâminas foram fixadas em metanol por 10 minutos e depois coradas com Giemsa por 15 min.

Para análise, a identificação foi realizada em duplo cego, um total de 2000 eritrócitos policromáticos (PCEs) por animal/lâmina foram analisados em microscopia óptica com aumento de 100x. Para análise do potencial mutagênico, eritrócitos policromáticos foram quantificados quanto à presença de micronúcleo. Para avaliar possíveis efeitos citotóxicos, a razão entre eritrócitos policromáticos e normocromáticos (PCEs ou NCEs, do inglês *Normochromic Erythrocytes*) foi calculada aleatoriamente analisando 500 eritrócitos. O índice

de análise está entre 0 e 1, quanto mais próximo de 0, maior a citotoxicidade, quanto mais próximo de 1, menor o risco de citotoxicidade (RIBEIRO et al, 2002).

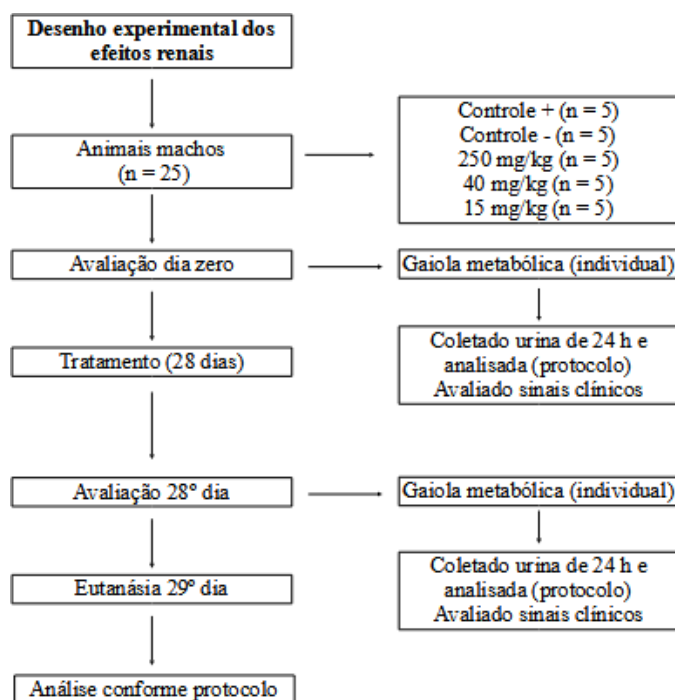
2.5 Análise histopatológica

Após o processo de coleta de sangue, os órgãos vitais (coração, pulmão, rim, fígado e baço) e órgãos reprodutivos (testículos, epidídimo, útero e ovários) serão pesados e dissecados. Amostras dos órgãos vitais serão fixadas em formalina tamponada a 10%. Após a fixação, os fragmentos serão clivados, desidratados com concentrações absolutas crescentes de etanol, diafanizados em xileno e incorporados em parafina. As secções serão cortadas com uma espessura de 5 µm, coradas com hematoxilina e eosina (H&E) e montados em lâminas de vidro para exame por microscopia de luz (MARTEY, ARMAH e OKINE, 2010).

2.6 Delineamento experimental de efeitos renais

Para o estudo de efeito diurético foram utilizados ratos Wistar machos e adultos, sendo os mesmos utilizados na toxicidade subaguda (n=5 animais por grupo). Os animais foram colocados em gaiolas metabólicas individuais e controlada a diurese por 24 h. A urina de 24 h foi coletada no zero e no vigésimo dia do protocolo de cada grupo, foram analisados o volume urinário, o pH e a excreção urinária de sódio, potássio, cálcio, magnésio, ácido úrico, creatinina e proteína (Kits específicos LABTEST *Diagnostics*). Foi coletado rim esquerdo e a bexiga, cortados em fragmentos simétricos e mantidos em formol a 10% para montagem do tecido em blocos de parafina. Após a inclusão em parafina, o tecido foi cortado na espessura de 4 µm e montado em lâminas. As lâminas serão coradas com hematoxilina-eosina e analisadas em microscópio óptico comum, para estudo microscópico (figura 6).

Figura 6. Desenho experimental dos efeitos renais.



Fonte: A autora, 2023.

2.7 Análise bioquímica e hematológica

Os parâmetros bioquímicos foram realizados para investigar os efeitos tóxicos que poderiam acontecer nos tecidos. Conforme as recomendações da ANVISA (2004) e da OECD (2008b) são quantificados sódio, potássio, glicose, colesterol total, ureia, creatinina, proteínas totais, albumina, cálcio, triglicerídeos e pelos menos duas enzimas indicativas de efeitos hepáticos (gamaglutamiltranspeptidase - GGT, alanina aminotransferase - ALT, aspartato aminotransferase - AST, fosfatase alcalina – FAL). Bem como todos os animais submetidos aos testes devem ser submetidos a uma autópsia onde a sejam avaliados órgãos macroscopicamente e microscopicamente.

Essas análises são realizadas preferencialmente no fígado, rins, gônadas (testículos e ovários), órgãos sexuais acessórios (epidídimos, próstata, glândulas seminais, útero e colo do útero), baço, pulmão, estômago, intestino, coração e cérebro. Os mesmos devem passar por um processo de limpeza dos tecidos aderentes, pesados e encaminhados para análise microscópica. Todas as lesões aparentes, bem como os órgãos suscetíveis de constituírem órgãos-alvo, também devem ser processados e analisadas histologicamente (ANVISA, 2004; OECD, 2008b).

2.8 Atividade anti-hiperglicemiante em ratos Wistar

O tratamento utilizado para o *diabetes mellitus* consiste principalmente em medicamentos sintéticos que atuam como medicamentos anti-hiperglicêmicos como a insulina, sulfonilureias, inibidores do peptidase-4 dipeptidyl, inibidores do co-transportador de sódio-glucose 2, entre outros (DARDANO et al., 2014).

De todos estes medicamentos artificiais disponíveis, insulina de ação intermédia, glibenclamida e metformina são os medicamentos aceitos por quase todos os países (BAZARGANI et al., 2014). Os fármacos sintéticos ajudam na gestão da doença, mas não há nenhum fármaco disponível que possa erradicar completamente a causa raiz da diabetes mellitus (RAWAT et al., 2013). Assim, os medicamentos tradicionais com propriedades anti-diabéticas estão a ser considerados para tratamento uma vez que têm menos efeitos secundários (DEY et al., 2018).

Em ensaios onde se tente descobrir um potencial farmacológico de um produto natural com intenção de testar substâncias que atuam nos níveis de glicemia, recomenda-se que em tais ensaios seja associado uma pesquisa sobre toxicidade para reafirmar o uso seguro do fármaco prospectado (DE LIMA et al., 2016; TRAESEL et al., 2017).

A indução de diabetes em animais provoca alterações fisiológicas e clínicas comuns em diabetes, com grande aumento nos níveis séricos. Logo também ocorre a ativação dos transportadores de Glicose-2 (GLUT2), também a formação de radicais livres que por sua vez ocasionam diversos tipos de lesões celulares (LENZEN, 2008, KAPPEL, 2012).

2.8.1 Delineamento experimental do bioensaio de atividade anti-hiperglicêmica

Foram utilizados ratos Wistar para os testes de toxicidade aguda, subaguda e efeitos renais (200 ± 5 g, 50-55 dias, $n = 30$). Os animais foram cedidos pelo Biotério da UFGD e mantido no biotério da Faculdade de Ciências da Saúde (FCS) da UFGD em caixas de polipropileno ($n = 5$), em temperatura controlada ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), ciclo escuro/claro de 12 h e livre demanda de água e comida. Os procedimentos experimentais seguiram as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal e de acordo com as diretrizes da Declaração Universal dos Direitos dos Animais com os Princípios Éticos em Pesquisa Animal e aprovado pelo Comitê de Ética para Uso de Animais da UFGD (Protocolo nº 78/2021) e conforme modelos experimentais padronizados em diversas pesquisas acerca do potencial antidiabético de produtos naturais (KAPPEL, 2012; KAPPEL et al., 2013).

2.8.2 Teste Oral de Tolerância à Glicose (TOTG)

Baseado em Kappel e colaboradores (2012), os animais normoglicêmicos foram mantidos em jejum por 12 horas, randomizados em cinco grupos distintos. Os animais foram gavados conforme randomização, o grupo controle hiperglicêmico sem qualquer tratamento recebem glicose (4g/kg); Grupo controle positivo os animais são tratados com o fármaco referência metformina (10 mg/kg) e subsequentemente recebem sobrecarga de glicose (4g/kg); Grupos 1, 2 e 4 receberam, o infuso de *Campomanesia pubescens*, nas respectivas doses: 250 mg/kg, 40 mg/kg e 15 mg/kg, para obtenção da curva dose-resposta e, após 30 minutos, foi administrada uma sobrecarga de glicose em cada animal (4g/kg).

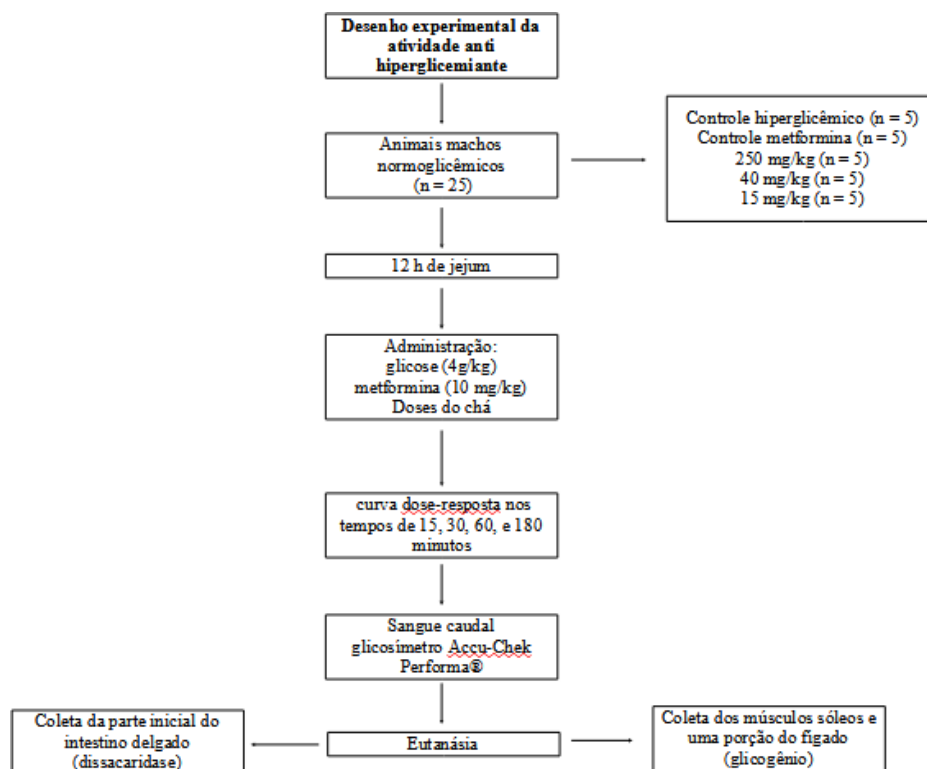
Os níveis de séricos de glicose plasmática foram verificados pela primeira vez no tempo zero para determinar os níveis em jejum, e depois foram submetidos aos respectivos tratamentos. Após 30 minutos, todos os animais receberam uma sobrecarga oral de glicose (Sigma Aldrich®) (4 g/kg de peso corporal) (PEDROSO et al., 2019). Esses níveis foram mensurados por meio de sangue periférico (caudal) em diferentes tempos: 15, 30, 60, e 180 minutos após a gavagem utilizando um glicosímetro Accu-Chek Performa®. Em seguida os animais foram submetidos à eutanásia, e submetidos à coleta da parte inicial do intestino delgado que foi reservada para a avaliação das atividades de dissacaridase, e os músculos sóleos e uma porção do fígado dissecados para determinar os níveis de glicogênio (FELIX et al., 2020).

2.8.3 Determinação do glicogênio hepático, muscular e dissacaridasas intestinais

Fígado e os músculos sóleos foram individualmente pesados e submetidos protocolo específico para precipitação do glicogênio hepático descrito por Krisman (1962) com pequenas modificações e inclusão do método para precipitação do glicogênio muscular proposto por Zannata e colaboradores (2008) também com modificações. Seguidamente para determinação das concentrações de glicogênio hepático e muscular utilizou-se a curva de calibração com base na substância padrão do glicogênio (PEDROSO, 2019). As análises espectrofotométricas foram realizadas a 460 nm e os resultados foram expressos em mg de glicogênio/g de tecido (KAPPEL et al, 2012). A avaliação da atividade de enzimas intestinais envolvidas na homeostasia da glicose, foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Kappel e colaboradores (2012) com pequenas adaptações. Realizado em triplicata, a

absorbância foi lida a 500 nm, expressa em atividade enzimática (U)/mg de proteína (KAPPEL et al, 2012) (Figura 7).

Figura 7. Desenho experimental da atividade anti-hiperglicemiante.



Fonte: A autora, 2023.

2.9 Tratamento dos dados

Foi realizada uma análise variância multivariada permutacional (Permanova) comparando os grupos e considerando múltiplas variáveis e ainda variáveis que não apresentem distribuição normal, por possuírem valores elevados. Também foram comparados os diferentes tratamentos (doses) considerando todas as variáveis ao mesmo tempo, quando constatado diferença significativa entre os grupos foi utilizado na sequência escalonamento multidimensional não métrico (nMDS), também análise de componentes principais (PCA). Para realizar as correções necessárias foi usado o teste de Bonferroni.

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Avaliar o perfil fitoquímico, toxicológico, genotóxico, mutagênico, efeitos renais e anti-hiperglicemiante do infuso das folhas de *Campomanesia pubescens* em ratos Wistar.

3.2 ESPECÍFICOS

Determinar a DL50 (dose letal para pelo menos 50% da população em estudo) do infuso pelo teste de toxicidade aguda.

Analisar a toxicidade sistêmica, parâmetros bioquímicos e histopatológicos dos animais tratados durante a toxicidade subaguda.

Avaliar a genotoxicidade e antigenotoxicidade do infuso das folhas de *C. pubescens* por meio do ensaio cometa.

Investigar os efeitos mutagênicos do infuso das folhas de *C. pubescens* por meio do ensaio do micronúcleo.

Avaliar os efeitos renais do infuso das folhas de *C. pubescens* nos animais tratados.

Avaliar a atividade anti-hiperglicemiante do infuso das folhas de *C. pubescens* nos animais tratados.

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELHAFEZ, Mohammad et al. Diagnostic performance of fractional excretion of sodium for the differential diagnosis of acute kidney injury: A systematic review and meta-analysis. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, v. 17, n. 6, p. 785-797, 2022.

ADA (American Diabetes Association). Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes – 2018. *Diabetes Care*. 2018;41(Suppl. 1): S13-S27 | <https://doi.org/10.2337/dc18-S002>.

ADA (American Diabetes Association). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2007 Jan;30 Suppl 1: 42-7.

ADA (American Diabetes Association). Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 1997; 20: 1183-1197.

ADA (American Diabetes Association). Standards of Medical Care in Diabetes – 2019.

ADA (American Diabetes Association). Standards of medical care in Diabetes-2016. The journal of clinical and applied research and education [Internet] 2016. Jan. [cited 2020 jan 15]. 39 (sup:1). Disponível em: <6-Standards-of-Care.pdf.>

ADA (American Diabetes Association). Standards of medical care in diabetes. *Diabetes Care*, v.34, supl.1, p. S62-S69, 2011.

AFANASIEVA, K.; ZAZHYTSKA, M.; SIVOLOB, A. (2010) Kinetics os comet formation in single-cell gel eletrophoresis: loops and fragments. *Eletrophoresis*, 31: 512-519.

AKTHAR, Mohd Sayeed; DEGAGA, Birhanu; AZAM, Tanweer. Antimicrobial activity of essential oils extracted from medicinal plants against the pathogenic microorganisms: A review. *J. Issues ISSN*, v. 2350, p. 1588, 2014.

ALI, Sehrish et al. Revisiting diuretic choice in chronic kidney disease. *Current opinion in nephrology and hypertension*, v. 31, n. 5, p. 406-413, 2022.

ALVES, Aline Medeiros et al. Caracterização física e química, fenólicos totais e atividade antioxidante da polpa e resíduo de gabioba. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 35, p. 837-844, 2013.

ALVES, Cassia. et al. Antiproliferative activity of essential oils from three plants of the Brazilian Cerrado: *Campomanesia adamantium* (Myrtaceae), *Protium ovatum* (Burseraceae) and *Cardiopetalum calophyllum* (Annonaceae). *Brazilian Journal of Biology*, v. 80, p. 290-294, 2019.

AMARAL, Érica Virgínia Estêfane de Jesus. et al. Análise de imagens radiográficas e germinação de sementes de *Campomanesia pubescens* (Mart. ex DC.) O. Berg (Myrtaceae Juss.) sob secagem. *Brazilian Journal of Biology*, v. 80, p. 777-782, 2019.

AMOABEDINY, G. H. et al. Guidelines for safe handling, use and disposal of nanoparticles. In: *Journal of physics: conference series*. IOP Publishing, 2009. p. 012037.

ANANTHI, R.; CHANDRA, N.; SANTHIYA, S. Genotoxic and antigenotoxic effects of *Hemidesmus indicus* R. Br. root extract in cultured lymphocytes. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 127, n. 2, p. 558–560, 2010.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 17, de 24 de fevereiro de 2000. Dispõe sobre o registro de medicamento fitoterápico. *Diário Oficial União*. 24 abr 2000.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 48, de 16 de março de 2004. Dispõe sobre o registro de medicamento fitoterápico. *Diário Oficial União*. 2004.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC 14 DE 31 de março de 2010. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. 2010.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Gerência de Avaliação de Segurança e Eficácia. Guia para condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos. 2ª versão. Brasília, 2013.a

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução-RDC nº 26, de 13 de maio de 2014. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos eo registro ea notificação de produtos tradicionais fitoterápicos. *Diario Oficial Uniao*, 2014.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitaria. Consolidado de normas da COFID. Versão V. 2015.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitaria. Estudos Não Clínicos Necessários Ao Desenvolvimento De Medicamentos Fitoterápicos E Produtos Tradicionais Fitoterápicos. Guia Nº 22/2019 – Versão 1. Brasília, 2019. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2977552/Guia+22+.pdf/8bec9e94-a3e2-4bb9-9e50-0f79cc876a8c>.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitaria. [Online] Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Medicamentos/Assunto+de+Interesse/Medicamentos+fitoterapicos>>.

ANZOLLIN, Gabriela Sabrina et al. Antidepressant-like effect of *Campomanesia xanthocarpa* seeds in mice: Involvement of the monoaminergic system. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, v. 12, n. 4, p. 309-317, 2022.

ARALDI, Rodrigo Pinheiro et al. Using the comet and micronucleus assays for genotoxicity studies: A review. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 72, p. 74-82, 2015.

ARAUJO, Fabio Fernandes et al. Wild Brazilian species of *Eugenia genera* (Myrtaceae) as an innovation hotspot for food and pharmacological purposes. *Food Research International*, v. 121, p. 57-72, 2019.

ARAÚJO, Marcela Carolina de Paula Michel et al. Acute and sub chronic toxicity study of aqueous extract from the leaves and branches of *Campomanesia velutina* (Cambess) O. Berg. *Journal of ethnopharmacology*, v. 201, p. 17-25, 2017.

BALLVE, Alice Cecilia. Plantas medicinais de uso popular: atlas farmacognóstico. Editora da ULBRA, 1995.

BANDARANAYAKE, Wickramasinghe M. Quality control, screening, toxicity, and regulation of herbal drugs. *Modern phytomedicine: turning medicinal plants into drugs*, p. 25-57, 2006.

BAPTISTA, Marcela Meneghetti et al. Traditional botanical knowledge of artisanal fishers in southern Brazil. *Journal of ethnobiology and ethnomedicine*, v. 9, n. 1, p. 1-16, 2013.

BAZARGANI, Yaser T. et al. Selection of essential medicines for diabetes in low and middle income countries: a survey of national essential medicines lists. *PloS one*, v. 9, n. 9, p. E106072, 2014.

BENNETT C. M; GUO M; DHARMAGE S. C. HbA1c as a screening tool for detection of Type 2 diabetes: a systematic review. *Diabetic Medicine*. 24:333–43; 2007.

BERNARDI RC, Santos-Junior LC, Guimarrães IC, Marcorini LFB, Antonialli-Junior WF, Cardoso CAL. Screening do potencial da peçonha da formiga *Odontomachus chelifer* (Fowler, 1980) como fonte de agentes terapêuticos. *Interbio*. 2017; 11: 55–62.

BETTI, C.; DAVINI, T.; GIANNESI, L.; LOPRIENO, N.; BARALE, R. (1994) Microgel electrophoresis assay (comet test) and SCE analysis in human lymphocytes from 100 normal subjects. *Mutat. Res.*, 307: 323-333.

BHASKAR, Anusha; NITHYA, V. Phytochemical evaluation by GC-MS and antihyperglycemic activity of *Mucuna pruriens* on streptozotocin induced diabetes in rats. 2021.

BLAVATTI, M. W. 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, 2004.

BODEKER, Gerard; ONG, Chi-Keong. WHO global atlas of traditional, complementary and alternative medicine. World Health Organization, 2005.

BONASSI, S. et al. An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. *Carcinogenesis*, v. 28, n. 3, p. 625–631, 2007.

BOSI, P.L et al. Prevalência de diabetes melito e tolerância à glicose diminuída na população urbana de 30 a 79 anos da cidade de São Carlos, São Paulo. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, v. 53, n. 6, p. 726-732, 2009.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Gerência de Medicamentos Específicos, Notificados, Fitoterápicos, Dinamizados e Gases Medicinais. Consolidado de normas de registro e notificação de fitoterápicos. Brasília, 2018.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE (MS), SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE, BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Diabetes Mellitus. Brasília, DF, 2006.

BRATER, D. Craig. Update in diuretic therapy: clinical pharmacology. In: *Seminars in nephrology*. WB Saunders, 2011. p. 483-494.

BREDA, Caroline A.; SANJINEZ-ARGANDOÑA, Eliana J.; DE AC CORREIA, Camila. Shelf life of powdered *Campomanesia adamantium* pulp in controlled environments. Food Chemistry, v. 135, n. 4, p. 2960-2964, 2012.

BROWN, Eric D.; WRIGHT, Gerard D. Antibacterial drug discovery in the resistance era. Nature, v. 529, n. 7586, p. 336-343, 2016.

CALIXTO, J. B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: A personal view. Journal of Ethnopharmacology, v. 100, n. 1-2, p. 131-134, 2005.

CARDOSO, C. A. L. Plantas do gênero *Campomanesia*: potencial medicinal e nutracêutico. UEMS, Dourados, 2021.

CARDOSO, C. A.L. et al. Fruit oil of *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg and *Campomanesia adamantium* O. Berg. Journal of Essential Oil Research, v. 21, n. 6, p. 481-483, 2009.

CARDOSO, Claudia AL; RÉ-POPPI, Nilva. Identification of the volatile compounds of flower oil of *Campomanesia pubescens* (Myrtaceae). Journal of Essential Oil Research, v. 21, n. 5, p. 433-434, 2009.

CARDOSO, Claudia Andrea Lima et al. Avaliação das atividades antiproliferativa e antioxidante em frutos de *Campomanesia pubescens*. Revista do Instituto Adolfo Lutz, v. 72, n. 4, p. 309-315, 2013.

CARDOSO, Claudia L.; KATAOKA, Vanessa MF; RÉ-POPPI, Nilva. Identification of the volatile compounds of flowers of *Campomanesia sessiliflora* O. Berg and *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg. Journal of Essential Oil Research, v. 22, n. 3, p. 254-256, 2010.

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

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, 2009.

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

CATELAN, Taline Baganha Stefanello et al. Evaluation of the toxicity and anti-inflammatory activities of the infusion of leaves of *Campomanesia guazumifolia* (Cambess.) O. Berg. Journal of ethnopharmacology, v. 226, p. 132-142, 2018.

CHANDRA, Harish et al. Antimicrobial resistance and the alternative resources with special emphasis on plant-based antimicrobials—a review. Plants, v. 6, n. 2, p. 16, 2017.

CHANG, Roberto 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, p. 1843-8, 2011.

CHIN, Young-Won et al. Drug discovery from natural sources. The AAPS journal, v. 8, n. 2, p. E239-E253, 2006.

COLLINS, A.R.; OSCOZ, A.A.; BRUNBORG, G.; GAIVÃO, I.; GIOVANNELLI, L.; KRUSZEWSKI, M.; SMITH, C.C.; STETINA, R. (2008) The comet assay: topical issues. *Mutagenesis*, 23(3): 143-151.

COLLINS, A. et al. The comet assay as a tool for human biomonitoring studies: The ComNet Project. *Mutation Research - Reviews in Mutation Research*, v. 759, n. 1, p. 27– 39, 2014.

COLLINS, A. R. The comet assay: A heavenly method! *Mutagenesis*, v. 30, n. 1, p. 1– 4, 2015.

COSYNS, J. P. et al. Urothelial lesions in Chinese-herb nephropathy. *American Journal of Kidney Diseases*, v. 33, n. 6, p. 1011–1017, 1999.

COUTINHO, Isabel D.; POPPI, Nilva Ré; CARDOSO, Claudia L. Identification of the volatile compounds of leaves and flowers in Guavira (*Campomanesia adamantium* O. Berg.). *Journal of Essential Oil Research*, v. 20, n. 5, p. 405-407, 2008.

COUTINHO, Isabel Duarte et al. Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) and evaluation of antioxidant and antimicrobial activities of essential oil of *Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg (Guavira). *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 45, p. 767-776, 2009.

CURY, Benhur Judah et al. Dimethyl cardamonin from fruits of *Campomanesia reitziana* D. Legrand promotes gastroprotection and gastric healing effects in rodents. *Chemistry & Biodiversity*, p. E202200727, 2022.

DA CONCEIÇÃO, R. A.; DA SILVA, P. N.; BARBOSA, M. L. C. Fármacos para o tratamento do Diabetes tipo II: uma visita ao passado e um olhar para o futuro. *Revista Virtual de Química*, v. 9, n. 2, p. 514-534, Mar.-Abr. 2017.

DA COSTA, Henrique Margues et al. Morphoanatomical study, seasonal variation, and larvicidal activity of volatile oils from the leaves of *Campomanesia pubescens* (DC.) O. Berg (Myrtaceae). *Research, Society and Development*, v. 10, n. 3, p. e35610313412-e35610313412, 2021.

DA SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J. A. P. *Genética Toxicológica*. 1. ed. Porto Alegre: Alcance, 2003. 424p.

DA SILVA, Luiz Everson et al. Essential oil yield and composition of native species of the Myrtaceae family from “Campos Gerais” of the Atlantic Forest in Parana State. *Ciência e Natura*, p. e45-e45, 2019.

DARDANO, Angela et al. Optimal therapy of type 2 diabetes: a controversial challenge. *Aging (Albany NY)*, v. 6, n. 3, p. 187, 2014.

DE FLORA, S.; FERGUSON, L. R. Overview of mechanisms of cancer chemopreventive agents. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, v. 591, n. 1–2, p. 8-15, 12/11/ 2005.

DE LIMA, F. F. et al. Study on the cytotoxic, genotoxic and clastogenic potential of *Attalea phalerata* Mart. Ex Spreng. Oil pulp in vitro and in vivo experimental models. PLoS One 11, 1–11. 2016.

DE LIMA, Nayara Vieira et al. First comprehensive study on total determination of nutritional elements in the fruit of the *Campomanesia adamantium* (Cambess.): Brazilian Cerrado Plant. International Archives of Medicine, v. 9, 2016.

DE OLIVEIRA FERNANDES, Thaís et al. *Campomanesia adamantium* (Myrtaceae) fruits protect HEPG2 cells against carbon tetrachloride-induced toxicity. Toxicology reports, v. 2, p. 184-193, 2015.

DE SOUZA DUARTE, Luiza et al. *Campomanesia* genus a literature review of nonvolatile secondary metabolites, phytochemistry, popular use, biological activities, and toxicology. Eclética Química, v. 45, n. 2, p. 12-22, 2020.

DE TOLEDO ESPINDOLA, P. P. dos Santos da Rocha. P., Carollo, CA, Schmitz, WO, Pereira, ZV, Vieira, MDC, et al, 2016.

DEPARTAMENTO DE ATENÇÃO BÁSICA. Estratégias para o cuidado da pessoa com doença crônica: diabetes mellitus. Caderno de atenção básica, n. 36, 2013.

DEY, Swarna Kamal et al. Antidiabetic activity of giant grass *Bambusa tulda*. Bangladesh Journal of Pharmacology, v. 13, n. 2, p. 134-2018, 2018.

DI STASI, L. C. et al. Medicinal plants popularly used in the Brazilian Tropical Atlantic Forest. Fitoterapia, v. 73, n. 1, p. 69-91, 2002.

DJERIDANE, A.; YOUSFI, M; NADJEMI, B.; BOUTASSOUNA, D.; STOCKER, P.; VIDAL, N. Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. Food Chemistry, v. 97, n. 1, p. 654–660, 2006. doi:10.1016/j.foodchem.2005.04.028

DO BRASIL, Flora et al. Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>.

DONADO-PESTANA, Carlos M. et al. Polyphenols of cambuci (*Campomanesia phaea* (O. Berg.)) fruit ameliorate insulin resistance and hepatic steatosis in obese mice. Food Chemistry, v. 340, p. 128169, 2021.

DOS SANTOS, Anaí L. et al. GC× GC/qMS analyses of *Campomanesia guazumifolia* (Cambess.) O. Berg essential oils and their antioxidant and antimicrobial activity. Natural product research, v. 33, n. 4, p. 593-597, 2019.

DOUNGNGERN, Thitima et al. Effect of albumin on diuretic response to furosemide in patients with hypoalbuminemia. American Journal of Critical Care, v. 21, n. 4, p. 280-286, 2012.

DOUSSEAU, Sara et al. Ecofisiologia da germinação de sementes de *Campomanesia pubescens*. Ciência Rural, v. 41, p. 1362-1368, 2011.

EKOR, Martins. The growing use of herbal medicines: issues relating to adverse reactions and challenges in monitoring safety. *Frontiers in pharmacology*, v. 4, p. 177, 2014.

EL MOUSSAOUI, Abdelfattah et al. Phytochemical identification, acute, and sub-acute oral toxicity studies of the foliar extract of *withania frutescens*. *Molecules*, v. 25, n. 19, p. 4528, 2020.

ENGELHARDT, Eliaz et al. Tratamento da Doença de Alzheimer: recomendações e sugestões do Departamento Científico de Neurologia Cognitiva e do Envelhecimento da Academia Brasileira de Neurologia. *Arquivos de Neuro-psiquiatria*, v. 63, p. 1104-1112, 2005.

ERNST, E. Toxic heavy metals and undeclared drugs in Asian herbal medicines. *Trends in Pharmacological Sciences*, v. 23, n. 3, p. 136–139, 2002.

FAIRBAIRN, D.W.; OLIVE, P.L.; O'NEILL, K.L. (1995) The Comet Assay: a comprehensive review. *Mutation Research*, 339: 37-59.

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

FERREIRA, Fabiana Borges Padilha et al. *Campomanesia xanthocarpa* (Mart.) O. Berg essential oil induces antileishmanial activity and remodeling of the cytoplasm organelles. *Natural Product Research*, v. 35, n. 24, p. 6112-6116, 2021.

FERREIRA, Leidiane C. et al. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Campomanesia adamantium*. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 145, n. 1, p. 100-108, 2013.

GODSCHALK, R. W. L. et al. DNA-repair measurements by use of the modified comet assay: An inter-laboratory comparison within the European Comet Assay Validation Group (ECVAG). *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, p. 1–8, 2013.

GOMES, S. M. et al. Anatomia foliar de espécies de Myrtaceae: contribuições à taxonomia e filogenia. *Acta Botanica Brasilica*, v. 23, n. 1, p. 224–238, 2009.

GOVAERTS, Rafaël et al. World checklist of Myrtaceae. Royal Botanic Gardens, 2008.

GUERRERO, F. M. G. et al. Investigação da toxicidade crônica das folhas de guavira (*Campomanesia pubescens*) em ratos machos. *Revista Fitos*, v. 5, n. 02, p. 64-72, 2010.

GUIMARÃES, A. G. et al. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of the essential oil of *Eugenia candolleana* DC., Myrtaceae, on mice. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, v. 19, n. 4, p. 883–887, 2009.

GUTERRES, Cassiano Vasques Frota et al. Drying, phytochemical analysis and the fungicide potential of oil-in-water nanoemulsion (O/A) incorporated with *Ocimum citriodurum* L. *Ciência e Natura*, v. 44, p. e10-e10, 2022.

HARTMANN, A. et al. Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. *Environmental Health Perspectives*, v. 101, n. SUPPL. 3, p. 225–229, 1993.

HAYASHI, M. et al. The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides. *Mutation Research*, v. 245, p. 245–249, 1990.

HAYASHI, M.; SOFUNI, T.; ISHIDATE, M. An application of Acridine Orange fluorescent staining to the micronucleus test. *Mutation Research Letters*, v. 120, n. 4, p. 241–247, 1983.

HODEK, P.; TREFIL, P.; STIBOROVÁ, M. Flavonoids-potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450. *Chemico Biological Interactions*, v. 139, n. 1, p. 1–21, 2002.

HOORN, Ewout J.; ELLISON, David H. Diuretic resistance. *American Journal of Kidney Diseases*, v. 69, n. 1, p. 136-142, 2017.

HUANG, Xiaohua et al. Everything we always wanted to know about furosemide but were afraid to ask. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, v. 310, n. 10, p. F958-F971, 2016.

IDAOMAR, M. et al. Genotoxicity and antigenotoxicity of some essential oils evaluated by wing spot test of *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, v. 513, n. 1-2, p. 61-68, 2002.

IDF (International Diabetes Federation Diabetes) Atlas: Eighth edition. 2017. Disponível em: < <https://diabetesatlas.org/en/>>.

IZZOTTI, Alberto et al. Interplay between *Helicobacter pylori* and host gene polymorphisms in inducing oxidative DNA damage in the gastric mucosa. *Carcinogenesis*, v. 28, n. 4, p. 892-898, 2007.

JAMES et al. - the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*, v. 26, suppl. 1, p. S5-S20, 2003.

JASMINE, R. et al. Activity of *Eugenia jambolana*, an ethnomedical plant, against drug-resistant bacteria. *Pharmaceutical Biology*, v. 48, n. 4, p. 405–410, 2010.

KAPPEL, B.P. (2007) Avaliação do efeito fotoprotetor de três extratos de plantas da Antártica por diferentes modelos biológicos. Dissertação – Programa de PósGraduação em Biologia Celular e Molecular. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 91 f.

KAPPEL, et al. Short and long-term effects of *Baccharis articulata* on glucose homeostasis.

KAPPEL, V. D. Estudo da atividade biológica de *Baccharis articulata*, *Musa x paradisiaca* e rutina na homeostasia da glicose em modelos experimentais in vivo e in vitro. Tese de doutorado UFSC. 2012.

KAPPEL, V. D. et al. Involvement of GLUT-4 in the stimulatory effect of rutin on glucose uptake in rat soleus muscle. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 65, n. 8, p. 1179-1186, 2013.

KASILO, O. M. J.; TRAPSIDA, J.-M. Decade of African traditional medicine, 2001–2010. *Afr. Health Mon*, , 2011.

KHALEDI, Mohammad et al. The prevalence of comorbid depression in patients with type 2 diabetes: an updated systematic review and meta-analysis on huge number of observational studies. *Acta diabetologica*, v. 56, n. 6, p. 631-650, 2019.

KIRSCH-VOLDERS, M. et al. Report from the in vitro micronucleus assay working group. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, v. 540, n. 2, p. 153–163, 2003.

KLAFKE, Jonatas Zeni et al. Study of oxidative and inflammatory parameters in LDLr-KO mice treated with a hypercholesterolemic diet: Comparison between the use of *Campomanesia xanthocarpa* and acetylsalicylic acid. *Phytomedicine*, v. 23, n. 11, p. 1227-1234, 2016.

KRISHNA, G.; HAYASHI, M. In vivo rodent micronucleus assay: Protocol, conduct and data interpretation. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, v. 455, n. 1–2, p. 155–166, 2000.

KRISMAN, C.R. A method for the colorimetric estimation of glycogen with iodine. *Anal. Biochem.* 1962, 4, 17–23.

KUHN, Daniel et al. Antibiofilm activity of the essential oil of *Campomanesia aurea* O. Berg against microorganisms causing food borne diseases. *LWT*, v. 108, p. 247-252, 2019.

KUMAR, V. et al. CYP 1A1 polymorphism and organochlorine pesticides levels in the etiology of prostate cancer. *Chemosphere*, v. 81, n. 4, p. 464-468, 2010.

KUMARAN, A. KARUNAKARAN, R. J. Antioxidant and free radical scavenging activity of an aqueous extract of *Coleus aromaticus*. *Food Chemistry*. v. 97, p. 109-114, 2006.

KUSKOSKI, E. M. et al. Frutos tropicais silvestres e polpas de frutas congeladas: atividade antioxidante, polifenóis e antocianinas. *Ciência Rural*, v. 36, n. 4, p. 1283–1287, 2006.

KUSKOSKI, Eugenia Marta et al. Wild fruits and pulps of frozen fruits: antioxidant activity, polyphenols and anthocyanins. *Ciência Rural*, v. 36, p. 1283-1287, 2006.

LALLI, C. A; TSUKUMO, D. M. L. Conceito, Diagnóstico, Classificação e Complicações Crônicas do Diabete Melito. In: LIMA, M. H. M; ARAÚJO, E. P, organizadores. *Paciente Diabético: cuidados de enfermagem*. Rio de Janeiro: MedBook; 2012. p. 3-22.

LANDRUM, Leslie R. *Campomanesia*, *Pimenta*, *Blepharocalyx*, *Legrandia*, *Acca*, *Myrrhinium*, and *Luma* (Myrtaceae). *Flora Neotropica*, v. 45, p. 1-178, 1986.

LÁZARO, Deyanira et al. Genotoxic assessment of aqueous extract of *Rhizophora mangle* L. (mangle rojo) by spermatozoa head assay. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, v. 15, n. 1, p. 0-0, 2010.

LEAO, Marcelo Machado et al. The potencial of *Campomanesia phaea* O. Berg Landrum (Cambuci) as natural source of vitamin C. *Athens Journal of Sciences*, v. 24, n. 1, p. 37-45, 2017.

LEME, J. A. C. A et al. Effects in short-term of Alloxan application to diabetes induction in wistar rats. *Bioscience Journal*, 2010.

LENZEN, S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia*, Berlin, v. 51, p. 216–226, 2008.

LESCANO, Caroline H. et al. Effect of polyphenols from *Campomanesia adamantium* on platelet aggregation and inhibition of cyclooxygenases: molecular docking and in vitro analysis. *Frontiers in Pharmacology*, v. 9, p. 617, 2018.

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

LIMBERGER, Renata P. et al. Chemical composition of essential oils from some *Campomanesia* species (Myrtaceae). *Journal of Essential Oil Research*, v. 13, n. 2, p. 113-115, 2001.

LORENZI, H. et al. *Frutas brasileiras e exóticas cultivadas (de consumo in natura)*. São Paulo: Instituto Platarum, 2006.

LORENZI, H.; SOUZA, W. C. *Botânica Sistemática. Guia ilustrado para identificação das família de fanerógamas nativas e exóticas no Brasil*. 2nd. ed Editora Plantarum, 2008.

MACHADO, M. et al. Effects of essential oils on the growth of *Giardia lamblia* trophozoites. *Natural Product Communications*, v. 5, n. 1, p. 137–141, 2010.

MACHATE, David Johane et al. Fatty acid profile and physicochemical, optical and thermal characteristics of *Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg seed oil. *Food Science and Technology*, v. 40, p. 538-544, 2020.

MACHATE, David Johane et al. Fatty acid profile and physicochemical, optical and thermal characteristics of *Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg seed oil. *Food Science and Technology*, v. 40, p. 538-544, 2020.

MADALOSSO, R. C, Oliveira, G. C, Martins MT, Vieira, A. E, Barbosa J, Caliari MV, Castilho RO, Tagliati CA. *Campomanesia lineatifolia* Ruiz & Pav. as a gastroprotective agent. *J Ethnopharmacol*. 2012 Feb 15;139(3):772-9. doi: 10.1016/j.jep.2011.12.014. Epub 2011.

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

MANSUR, J. D. S., Breder, M. N. R., Mansur, M. C. D. A., & Azulay, R. D. (1986). Determinação do fator de proteção solar por espectrofotometria. *An. Bras. Dermatol*, 121-4.

MARIDASS, M. Composition and anti-inflammatory activity of the essential oil of *Eugenia discifera* (Myrtaceae). *International Journal of Essential Oil Therapeutics*, v. 2, n. 4, p. 163–166, 2008.

MARIN, Rafaela 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.

MARKMAN, Blanca Elena Ortega; BACCHI, Elfriede Marianne; KATO, Edna Tomiko Myiake. Antiulcerogenic effects of *Campomanesia xanthocarpa*. *Journal of*

ethnopharmacology, v. 94, n. 1, p. 55-57, 2004.

MARQUES R. C. P. et al. Evaluation of the mutagenic potential of yangambin and of the hydroalcoholic extract of *Ocotea duckei* by the Ames test. Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, v. 536, n. 1–2, p. 117–120, 2003.

MARTELLO, M. D. et al. *Campomanesia adamantium* extract induces DNA damage, apoptosis, and affects cyclophosphamide metabolism. Genet Mol Res, v. 15, n. 2, p. 1-11, 2016.

MCCONNELL, Oliver et al. Enantiomeric separation and determination of absolute stereochemistry of asymmetric molecules in drug discovery—building chiral technology toolboxes. Chirality: The Pharmacological, Biological, and Chemical Consequences of Molecular Asymmetry, v. 19, n. 9, p. 658-682, 2007.

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, 2011.

MEYER BN., Ferrigni NR., Putnam JE., Jacobsen LB., Nichols DE., McLaughlin JL. 1982. Brine Shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. Planta Médica 45, 31-34.

MOHAMED, T.; ENDOH, D.; OIKAWA, S. DNA damage of blood lymphocytes and neutrophils in cattle with lymphosarcoma. Veterinarni Medicina, v. 56, n. 10, p. 504–509, 2011.

MORAIS, Ingrid Beatriz de Melo et al. Hypotensive activity of *Campomanesia xanthocarpa* leaf extract: beyond angiotensin II type 1 receptor blockage. Natural Product Research, v. 35, n. 22, p. 4798-4802, 2021.

MOTA, K. S. de L. et al. Flavonoids with gastroprotective activity. Molecules, v. 14, n. 3, p. 979–1012, 2009.

MOURA-COSTA, Gislaïne F. et al. Antimicrobial activity of plants used as medicinals on an indigenous reserve in Rio das Cobras, Paraná, Brazil. Journal of ethnopharmacology, v. 143, n. 2, p. 631-638, 2012.

MUKHERJEE, P. W. Quality Control of Herbal Drugs: An Approach to Evaluation of Botanicals. New Delhi, India: Business Horizons Publishers, 2002.

MÜLLER, T. D. et al. The new biology and pharmacology of glucagon. Physiological reviews, v. 97, n. 2, p. 721-766, 2017.

NATARAJAN, A. T. Mechanisms for induction of mutations and chromosome alterations. Environmental Health Perspectives, v. 101, n. SUPPL. 3, p. 225–229, 1993.

NESELLO, Luciane Angela Nottar et al. Chemical composition and antinociceptive potential of *Campomanesia reitziana* fruits. Journal of medicinal food, v. 19, n. 5, p. 518-520, 2016.

NERI, M.; MILAZZO, D.; UGOLINI, D.; MILIC, M.; CAMPOLONGO, A.; PASQUALETTI, P.; BONASSI, S. (2015) Worldwide interest in the comet assay: a bibliometric study. Mutagenesis, 30:

155-163.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years. *Journal of Natural Products*. v.70, n.3, p.461-477, 2007.

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

NOROOZI, M. et al. Effects of flavonoids and vitamin C on oxidative DNA damage to human lymphocytes. *American Journal of Clinical Nutrition*, v. 67, n. 6, p. 1210–1218, 1998.

NOVAK, James E.; ELLISON, David H. Diuretics in States of Volume Overload: Core Curriculum 2022. *American Journal of Kidney Diseases*, 2022.

GOTTSLIEB, Stephen S. et al. The effects of diuresis on the pharmacokinetics of the loop diuretics furosemide and torsemide in patients with heart failure. *The American journal of medicine*, v. 104, n. 6, p. 533-538, 1998.

OECD. OECD Guideline for Testing of Chemicals. No 401: Acute Oral Toxicity.

OECD. OECD Guideline for Testing of Chemicals. No 420: Acute Oral Toxicity - Fixed Dose Procedure. Paris Organisation for Economic Co-operation and Development, 2001a. Disponível em: <http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-420-acute-oral-toxicity-fixed-dose-procedure_9789264070943-en>.

OECD. OECD Guideline for Testing of Chemicals. No 423: Acute Oral toxicity - Acute Toxic Class Method. Paris Organisation for Economic Co-operation and Development, 2001b. Disponível em: <http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-423-acute-oral-toxicity-acute-toxic-class-method_9789264071001-en>.

OECD. OECD Guideline for the testing of chemicals. No 474: Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test Paris, 2016b.

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

OECD. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Test No. 407: Repeated dose 28- day oral toxicity study in rodents. Paris Organisation for Economic Co-operation and Development, 2008b.

OECD. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Test No. 425: Acute Oral Toxicity: Up-and-Down Procedure. Paris Organisation for Economic Co-operation and Development. 2008a. Disponível em: <http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-425-acute-oral-toxicity-up-and-down-procedure_9789264071049-en;jsessionid=1c4h6pdgxaolt.x-oecd-live-03>.

OGURTSOVA, Katherine et al. IDF diabetes Atlas: Global estimates of undiagnosed diabetes in adults for 2021. *Diabetes Research and Clinical Practice*, v. 183, p. 109118, 2022.

OLDONI, Tatiane Luiza C. et al. Antihyperglycemic activity of crude extract and isolation of phenolic compounds with antioxidant activity from *Moringa oleifera* Lam. leaves grown in Southern Brazil. Food Research International, v. 141, p. 110082, 2021.

OLIVEIRA, J. D. et al. Rendimento, composição química e atividades antimicrobiana e antioxidante do óleo essencial de folhas de *Campomanesia adamantium* submetidas a diferentes métodos de secagem. Revista Brasileira de Plantas Medicinais, v. 18, p. 502-510, 2016.

OLIVEIRA, Juliana Dantas de et al. Chemical composition of essential oil extracted from leaves of *Campomanesia adamantium* subjected to different hydrodistillation times. Ciência Rural, v. 47, 2016.

OSSANA, Natalia Alejandra; CASTAÑÉ, Patricia Mónica; SALIBIÁN, Alfredo. Use of *Lithobates catesbeianus* tadpoles in a multiple biomarker approach for the assessment of water quality of the *Reconquista river* (Argentina). Archives of environmental contamination and toxicology, v. 65, n. 3, p. 486-497, 2013.

PACHECO, L. A. et al. Chemical characterization and antimicrobial activity of *Campomanesia aurea* against three strains of *Listeria monocytogenes*. Brazilian Journal of Biology, v. 81, p. 69-76, 2020.

PADILLA, A. Marina et al. In vitro antiviral activity of Brazilian Cerrado plant extracts against animal and human herpesviruses. Journal of Medicinal Plants Research, v. 12, n. 10, p. 106-115, 2018.

PANSERA, M. R.; SANTOS, A. C. A.; PAESE, K.; WASUM, R.; ROSSATO, M.; ROTA, L. D.; PAULETTI, G. F.; SERAFINI, L. A. Análise de taninos totais em plantas aromáticas e medicinais cultivadas no Rio Grande do Sul. Revista Brasileira de Farmacognosia, v. 13, n. 1, p. 17-22, 2003.

PASCOAL, Aislan CRF et al. Essential oil from the leaves of *Campomanesia guaviroba* (DC.) Kiaersk.(Myrtaceae): chemical composition, antioxidant and cytotoxic activity. Journal of Essential Oil Research, v. 23, n. 5, p. 34-37, 2011.

PAVAN, Fernando Rogério et al. Evaluation of anti-*Mycobacterium tuberculosis* activity of *Campomanesia adamantium* (Myrtaceae). Química Nova, v. 32, p. 1222-1226, 2009.

PEDROSO, T. F. M. Chemical constituents of *Cochlospermum regium* (Schrunk) Pilg. Root and its antioxidant, antidiabetic, antiglycation, and anticholinesterase effects in Wistar rats. Biomedicine & Pharmacotherapy, v. 111, p. 1383-1392, Mar. 2019.

PEIXOTO, N. et al. Avaliação do crescimento inicial de populações de gabioba em Ipameri. Congresso de Ensino, Pesquisa e Extensão da UEPG, p. 6, 2005.

PETRY, Vanessa S. et al. Patterns of genetic diversity, spatial genetic structure and gene flow in *Campomanesia xanthocarpa*: insights from SSR markers of different genomic origins. Anais da Academia Brasileira de Ciências, v. 93, 2021.

PRADELLA, Larissa Chaves et al. Evaluation of the scientific activity of the leaf of the species *Campomanesia pubescens* in wound model infected by *Staphylococcus aureus*. Bioscience Journal, v. 37, n. e37032, p. 1981-3163, 2021.

QUEIROZ F. M. D. et al. Evaluation of (anti) genotoxic activities of *Phyllanthus niruri* L. in rat bone marrow using the micronucleus test. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, v.49, n.1, p.135-148, 2013.

RAM, Amritanshu et al. Comparison of lymphocyte apoptotic index and qualitative DNA damage in yoga practitioners and breast cancer patients: A pilot study. International journal of yoga, v. 6, n. 1, p. 20, 2013.

RAWAT, S.; KUMAR, N.; KOTHIYAL, P. Evaluate the antidiabetic activity of *Myrica esculenta* leaves in streptozotocin induced diabetes in rat. Int J Univ Pharm Bio Sci, v. 2, p. 510-25, 2013.

RAYNOR, D. K.; DICKINSON, R.; KNAPP, P.; LONG, A. F.; NICOLSON, D. J. Buyer beware? Does the information provided with herbal products available over the counter enable safe use? BMC Medicine, v. 9, n. 1, p. 94, 2011.

REGGINATO, A. et al. Antidiabetic and hypolipidemic potential of *Campomanesia xanthocarpa* seed extract obtained by supercritical CO₂. Brazilian Journal of Biology, v. 81, p. 621-631, 2020.

REGNER, G.G. et al. Toxicological evaluation of *Pterocaulon polystachyum* extract: A medicinal plant with antifungal activity. Environmental Toxicology and Pharmacology, v. 31, n. 1, p. 242–249, 2011.

RIBEIRO, L. Teste do micronúcleo em medula óssea de roedores in vivo. In: RIBEIRO, L.; FÁVERO, D. (Eds.). Mutagênese Ambiental. Canoas: ULBRA, 2003. p. 173–200. 2003.

ROBINSON, M.M.; Zhang, X. The World Medicines Situation 2011, Traditional Medicines: Global Situation, Issues and Challenges; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2011.

ROCHA, E. O. Avaliação dos constituintes fenólicos e voláteis, atividade antioxidante e antimicrobiana de *Campomanesia pubescens* (DC.) O. Berg (Gabirola). (Dissertação de Mestrado) Programa de Pós-graduação do Instituto de Química. Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia-MG. 2011.

ROCHA, Edmilson de Oliveira et al. Avaliação dos constituintes fenólicos e voláteis, atividade antioxidante e antimicrobiana de *Campomanesia pubescens* (DC.) O. Berg. 2011.

RODRIGUES, H. G.; MEIRELES, C. G.; LIMA, J. T.; TOLEDO, G. P.; CARDOSO, J. L.; GOMES, S. L. Efeito embriotóxico, teratogênico e abortivo de plantas medicinais. Revista Brasileira de Plantas Medicinais. v.13, n.3, p.359-366, 2011.

SALMAZZO, Gustavo Ruivo et al. Chemical composition and antiproliferative, antioxidant and trypanocidal activities of the fruits from *Campomanesia xanthocarpa* (Mart.) O. Berg (Myrtaceae). Natural product research, v. 35, n. 5, p. 853-857, 2021.

SANTOS, Anai L. et al. GC× GC/qMS analyses of *Campomanesia guazumifolia* (Cambess.) O. Berg essential oils and their antioxidant and antimicrobial activity. Natural product research, v. 33, n. 4, p. 593-597, 2019.

SANTO, Samara de Barros Espírito et al. Propagação vegetativa ex vitro por estaquia de duas espécies de Guavira (*Campomanesia adamantium* (Cambess) O. Berg e *Campomanesia pubescens* (DC.) O. Berg). ANAIS DO ENIC, 2019.

SBD (Sociedade Brasileira De Diabetes). Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes 2015-2016. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Diabetes; 2016. Disponível em: <http://www.diabetes.org.br/sbdonline/images/docs/DIRETRIZES-SBD-2015-2016.pdf>

SBD (Sociedade Brasileira De Diabetes). Posicionamento Oficial SBD nº 01/2019. Conduta Terapêutica no Diabetes Tipo 2: Algoritmo SBD; 2019 b.

SCHMEDA-HIRSCHMANN, G. Flavonoids from calycorectes, campomanesia, eugenia and hexachlamys species. Fitoterapia (Milano), v. 66, n. 4, p. 373-374, 1995.

SCHULZE, P. Christian et al. Effects of early empagliflozin initiation on diuresis and kidney function in patients with acute decompensated heart failure (EMPAG-HF). Circulation, v. 146, n. 4, p. 289-298, 2022.

SHAH, P. et al. Impact of lack of suppression of glucagon on glucose tolerance in humans.

SHAH, Shaily Umang. Importance of Genotoxicity & S2A guidelines for genotoxicity testing for pharmaceuticals. IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences, v. 1, n. 2, p. 43-54, 2012.

SHIMIZU, N.; SHIMURA, T.; TANAKA, T. Selective elimination of acentric double minutes from cancer cells through the extrusion of micronuclei. Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, v. 448, n. 1, p. 81-90, 2000.

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, 2011.

SILVA TEIXEIRA, J. P., et al. Perfil epidemiológico dos casos de intoxicação por plantas medicinais no Brasil de 2012 a 2016. Brazilian Journal of Development, 6(10), 82199-82209.

SILVA, Jose RM; CARDOSO, Claudia AL; RE-POPPI, Nilva. Essential oil composition of the leaves of *Campomanesia pubescens*. Chemistry of natural compounds, v. 45, n. 4, p. 565-567, 2009.

SILVA, Jose R. M ; RÉ-POPPI, Nilva; CARDOSO, Claudia A. L.. Fruit oil of *Campomanesia pubescens* (Myrtaceae). Journal of Essential Oil Research, v. 21, n. 4, p. 315-316, 2009.

SILVA, T.; LOPES, L. M. X. Aryltetralol and aryltetralone lignans from *Holostylis reniformis*. Phytochemistry, v. 67, n. 9, p. 929-937, 2006.

SINITOX- Sistema Nacional De Informações Tóxico-Farmacológicas - Dados de Intoxicação – Dados Nacionais – Fiocruz – Brasil, 2014. Disponível em <https://sinitox.iciet.fiocruz.br/dados-nacionais>.

SINITOX- Sistema Nacional De Informações Tóxico-Farmacológicas - Dados de Intoxicação – Dados Nacionais. Fiocruz – Brasil, 2016. Disponível em <https://sinitox.iciet.fiocruz.br/dados-nacionais>.

SISODIA, S. S.; BHATNAGAR, M. Hepatoprotective activity of *Eugenia jambolana* lam. In carbon tetrachloride treated rats. Indian Journal of Natural Products and Resources, v. 8, n. 3, p. 291, 2009.

SOUZA-MOREIRA, Tatiana M. et al. Antidiarrheal activity of *Campomanesia xanthocarpa* fruit. Journal of Medicinal Food, v. 14, n. 5, p. 528-531, 2011.

SOUZA, Jaqueline Lima da conceição et al. Caracterização física e química de gabioba e murici. Revista de Ciências Agrárias, v. 42, n. 3, p. 792-800, 2019.

SOUZA, P. M. et al. PBAT biodegradable mulch films: Study of ecotoxicological impacts using *Allium cepa*, *Lactuca sativa* and HepG2/C3A cell culture. Chemosphere, v. 256, p. 126985, 2020.

SOUZA, Ricardo B. de et al. Biologia de *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) em frutos de *Campomanesia xanthocarpa*. In: Embrapa Uva e Vinho-Resumo em anais de congresso (ALICE). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 25., 2014, Goiânia, GO. Resumos... Goiânia: Embrapa Arroz e Feijão; Universidade Federal de Goiás, 2014., 2014.

SPONCHIADO, G. et al. Quantitative genotoxicity assays for analysis of medicinal plants: A systematic review. Journal of ethnopharmacology, v. 178, p. 289- 296, 2016.

SWAPAN, S.; DEY, P. Micronucleus and Its Applications. Diagnostic cytopathology, v. 40, n. 1, p. 84–90, 2010.

TERRADAS, M. et al. Genetic activities in micronuclei: Is the DNA entrapped in micronuclei lost for the cell? Mutation Research - Reviews in Mutation Research, v. 705, n. 1, p. 60–67, 2010.

TICE, R. R. et al. The single cell gel/ comet assay: guidelines for in vitro e in vivo genetic toxicology testing. Mutatation Research. v. 35, p. 206-221, 2000.

TRAESEL, G. K. et al. Acute and subacute (28 days) oral toxicity assessment of the oil extracted from *Acrocomia aculeata* pulp in rats. Food Chemical and Toxicology, v.74, p.320-325, 2014.

TRAESEL, G.K. et al. Safety Assessment of Oil from Pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.): Evaluation of the Potential Genotoxic and Clastogenic Effects. J. Med. Food 0, 1–8. 2017.

VALLILO, M.I., LAMARDO, L.C.A., GABERLOTTI, M.L., OLIVEIRA, E., & MORENO DE, P.R.H. (2006b). Composição química dos frutos de *Campomanesia adamantium* (Cambessédes) O. Berg. Cienc. e Tecnol. Aliment. 26(4):805–810.

VALLILO, MARIA I.; BUSTILLOS, OSCAR V.; AGUIAR, OSNY T. de. Identificacao de terpenos no oleo essencial dos frutos de *Campomanesia adamantium* (Cambessedes) O. Berg-MYRTACEAE. Revista do Instituto Florestal de Sao Paulo, 2006.

VANHERWEGHEM, J. L.; DEGAUTE, J. P. The policy of admission to the education in medicine and dentistry in the French-speaking community of Belgium. Acta clinica Belgica, v. 53, n. 1, p. 2–3, 1998.

VASCONCELOS, Loren Cristina et al. Chemical composition, phytotoxicity and cytogenotoxicity of essential oil from leaves of *Psidium guajava* L. cultivars. Research, Society and Development, v. 10, n. 9, p. e6110917710-e6110917710, 2021.

VILLAS BOAS, Gustavo Roberto 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, 2018.

VILLAS BOAS, Gustavo Roberto et al. The ethanolic extract obtained from *Campomanesia pubescens* (DC) 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, 2020.

VISCARDI, Danieli Z. et al. Anti-inflammatory, and antinociceptive effects of *Campomanesia adamantium* microencapsulated pulp. Revista Brasileira de Farmacognosia, v. 27, p. 220-227, 2017.

WCZASSEK, L. R.; PONTES, V. C. B.; GAMBERINI, M. T. Pharmacological evaluation of the hydro-alcoholic extract of *Campomanesia phaea* fruits in rats. Brazilian Journal of Biology, v. 80, p. 601-606, 2019.

WHO (World Health Organization). et al. 1998. Regulatory situation of herbal medicines: a worldwide review. Geneva: World Health Organization, 1998.

WHO (World Health Organization). Global Report on Diabetes. 2016. Disponível em:

WOJEWODZKA, Maria et al. Treatment with silver nanoparticles delays repair of X-ray induced DNA damage in HepG2 cells. Nukleonika, v. 56, p. 29-33, 2011.

XIE, Hong; MASON, Michael M.; WISE SR, John Pierce. Genotoxicity of metal nanoparticles. 2011.

XIE, Yan; AL-ALY, Ziyad. Risks and burdens of incident diabetes in long COVID: a cohort study. The Lancet Diabetes & Endocrinology, v. 10, n. 5, p. 311-321, 2022.

XU, Zhou et al. Chemical composition, antioxidant and antihyperglycemic activities of the wild *Lactarius deliciosus* from China. Molecules, v. 24, n. 7, p. 1357, 2019.

5 APÊNDICES

Artigo 1: Revista Journal of Ethnopharmacology (Qualis A1)

<https://www.elsevier.com/journals/journal-of-ethnopharmacology/0378-8741/guide-for-authors>

EVALUATION OF THE PRECLINICAL TOXICITY AND DIURETIC EFFECTS OF THE LEAF INFUSION OF *Campomanesia pubescens* IN RATS

Dioelen Virgínia Borges Souza de Aquino Coelho^{a*}, Larissa Pires Mueller^a, Laís Chancare Garcia^a, Ramão Souza de Deus Junior^a, Gustavo Roberto Villas Boas^b, Cláudia Andrea Lima Cardoso^c, Sidnei Eduardo Lima-Junior^c, Márcio Eduardo de Barros^a, Sílvia Aparecida Oesterreich^a.

^a Faculty of Health Sciences, Federal Federal University of Grande Dourados, Dourados, Mato Grosso do Sul, Brazil. Email: dioaquinocoelho@gmail.com, larissapiresmueller@gmail.com, laisgarcianutri@gmail.com, ramaojunior@ufgd.edu.br, marciobarros@ufgd.edu.br, silviooesterreich@gmail.com.

^b Center of Biological Sciences and Health, Federal University of Western Bahia, Barreiras, Bahia, Brazil. Email: gustavo.villasboas@ufob.edu.br.

^c Center of Studies in Natural Resources, State University of Mato Grosso do Sul (UEMS), Mato Grosso do Sul, Brazil. Email: claudia@uems.br, selimajunior@hotmail.com.

***Authors to whom correspondence should be addressed**

Faculty of Health Sciences, Federal University of Grande Dourados. Rodovia Dourados–Itahum, Km 12. Mato Grosso do Sul, Brazil. Tel number : +55-67-99829-1456, E-mail addresses dioaquinocoelho@gmail.com.

Authors' contributions

Dioelen Virginia Borges Souza de Aquino Coelho^{a*} and Silvia Aparecida Oesterreich^a:

Responsible for conducting the experiments and developing the research..

Dioelen Virginia Borges Souza de Aquino Coelho^{a*} and Larissa Pires Mueller^a:

Responsible for extract preparation, administration of the treatments in the rats, maintenance of the animals, organization of the experiments. In addition, they collaborated with the maintenance of the animals in the sectoral vivarium of the university

Dioelen Virginia Borges Souza de Aquino Coelho^{a*}, Marcio Eduardo de Barros^a:

Responsible and collaborated with developing the effect diuretic.

Dioelen Virginia Borges Souza de Aquino Coelho^{a*}, Larissa Pires Mueller^a, Lais

Chancare Garcia^a, Gustavo Roberto Villas Boas^b , and Silvia Aparecida Oesterreich^a:

Collaborated with the development of the test toxicity acute and subacute.

Ramão Souza de Deus Junior^a and Dioelen Virginia Borges Souza de Aquino Coelho^{a*}:

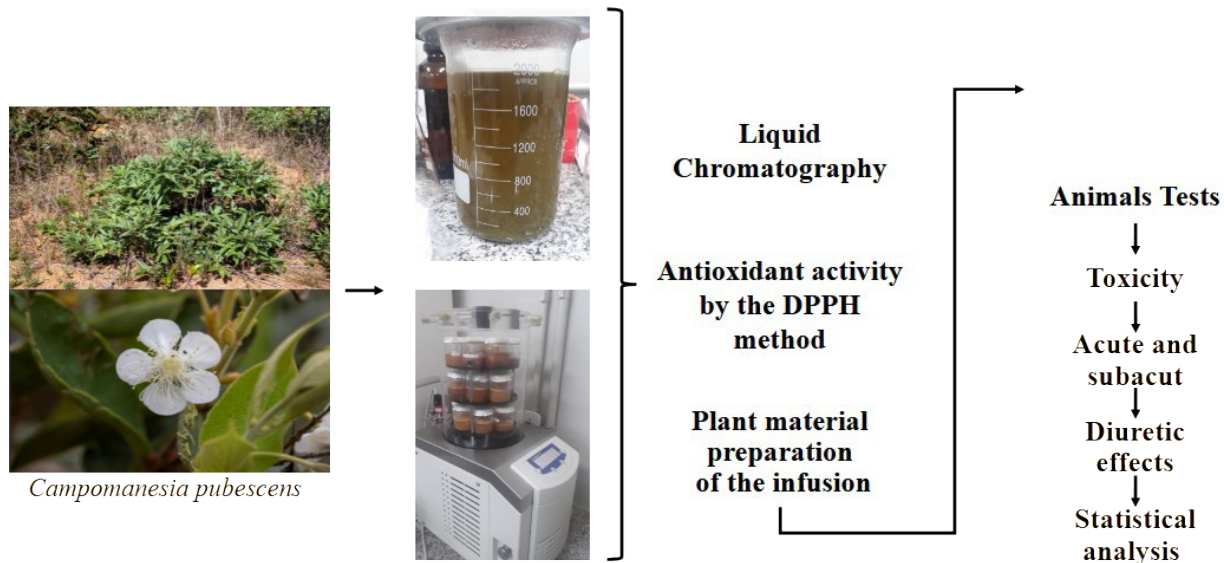
Responsible for and collaborator in the histology development.

Claudia Andrea Lima Cardoso^c: Responsible for preparation and analysis of the extract of the plant.

Sidnei Eduardo Lima-Junior^c: Responsible for statistical analysis.

All authors contributed to the writing and review of the article.

Graphical Abstract - Ethnopharmacological relevance



Artigo 2: Revista Journal of Ethnopharmacology (Qualis A1)

<https://www.elsevier.com/journals/journal-of-ethnopharmacology/0378-8741/guide-for-authors>

EVALUATION OF *Campomanesia pubescens* LEAVES INFUSION: ANALYSIS OF TOXICOGENETICS AND ANTIHYPERGLYCEMIC ACTIVITY IN RATS

Dioelen Virgínia Borges Souza de Aquino Coelho^{a*}, Larissa Pires Mueller^a, Laís Chancare Garcia^a, Ramão Souza de Deus Junior^a, Gustavo Roberto Villas Boas^b, Claudia Andrea Lima Cardoso^c, Sidnei Eduardo Lima-Junior^c, Virginia Demarchi Kappel Trichez^a, Márcio Eduardo de Barros^a, Silvia Aparecida Oesterreich^a.

^a Faculty of Health Sciences, Federal Federal University of Grande Dourados, Dourados, Mato Grosso do Sul, Brazil. Email: dioaquinocoelho@gmail.com, larissapiresmueller@gmail.com, laisgarcianutri@gmail.com, ramaojunior@ufgd.edu.br, virginiakappel@ufgd.edu.br, marciobarros@ufgd.edu.br, silviaoesterreich@gmail.com.

^b Center of Biological Sciences and Health, Federal University of Western Bahia, Barreiras, Bahia, Brazil. Email: gustavo.villasboas@ufob.edu.br.

^c Center of Studies in Natural Resources, State University of Mato Grosso do Sul (UEMS), Mato Grosso do Sul, Brazil. Email: claudia@uems.br, selimajunior@hotmail.com.

*Authors to whom correspondence should be addressed

Faculty of Health Sciences, Federal University of Grande Dourados. Rodovia Dourados–Itahum, Km 12. Mato Grosso do Sul, Brazil. Tel number : +55-67-99829-1456, E-mail addresses dioaquinocoelho@gmail.com.

Authors' contributions

Dioelen Virginia Borges Souza de Aquino Coelho^{a*} and Silvia Aparecida Oesterreich^a:

Responsible for conducting the experiments and developing the research.

Dioelen Virginia Borges Souza de Aquino Coelho^{a*} and Larissa Pires Mueller^a:

Responsible for the development of the comet assay and micronucleus test.

Dioelen Virginia Borges Souza de Aquino Coelho^{a*}, Virginia Demarchi Kappel Trichez

^a: Responsible and collaborated with developing the anti-hyperglycemic activity.

Dioelen Virginia Borges Souza de Aquino Coelho^{a*}, Larissa Pires Mueller^a, Lais Chancare Garcia^a, Ramão Souza de Deus Junior^a, Gustavo Roberto Villas Boas^b, Marcio Eduardo de Barros and Silvia Aparecida Oesterreich^a: Collaborated with the development of the genotoxicity, mutagenicity and cytotoxicity tests..

Claudia Andrea Lima Cardoso^c: Responsible for preparation and analysis of the extract of the plant.

Sidnei Eduardo Lima-Junior^c: Responsible for statistical analysis.

All authors contributed to the writing and review of the article.

7.1 PARECER DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



FUNDAÇÃO UNIVERSITÁRIA DE FORTALEZA
PRÓ-REITORIA DE ENSINO

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CE

Domadas:-!MSr 2S de setembro de 2.022,

CERTIFICADO

certifi "II"Kil:I .a inlln.il.:i wim ii! .

dli "III• ,u.tl.&t.;,i,l'eniM'a ll;, ""_Y'CI"""""""" .trNi/

1:tfJi | .: CNCR:III do chá das folhas de Campomanesi

pu DC.,} a l#ER.G nIM.t'_,_ regi5a lli o p.rotoeolo

de rll' 18{2021, a li'.i.Eitfe de - qie

- .. prod.!ii;Do,. m o ,e/00 Llil o i fib

Chordata I'M , 0 1- -11 q"UI...:I de 'nte

(w etinci).. etiCOI +2 . l os preceitos da Lei ril> 1L79.4, de DB de

00 lliro de 2DIl3r II" 6..899, de .15 de J de 2003, e 00i1'1 as;

da.51pelo CORse:11 N.:d . I de E:tp: tit .Arir.nal

(CONCEA), e riill Ct"lml5srio de Eta M u Anifi

(!l) lll f:jj de £bJt t!m, em . "llo d

30111/2021.

do projem de	() Ensino (X) P
	1{1J1/2(J11 .a 2!J103J.ME
Nº de animais	Rattus norvegicus - Ratos Wistar
Peso/cidade	1100Fatos.
-2.m	Ratos – 8 a 12 semanas/200 a 300g
	Ratos – 60 machos e 40 fêmeas
	Biotério Central UFGD

Plantation

Daniela Torres Cantadori
Coordenadora em exercício CEUA/UFGD