

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E AMBIENTAIS**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E DOS PERFIS
TOXICOLÓGICO E GENOTÓXICO DO EXTRATO AQUOSO DAS
FOLHAS DE *Alibertia edulis* (Rich.) A. Rich. ex DC.**

SARA EMILIA LIMA TOLOUEI MENEGATI

DOURADOS

2016

SARA EMILIA LIMA TOLOUEI MENEGATI

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E DOS PERFIS
TOXICOLÓGICO E GENOTÓXICO DO EXTRATO AQUOSO DAS
FOLHAS DE *Alibertia edulis* (Rich.) A. Rich. ex DC.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal da Grande Dourados – Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Biodiversidade

Orientadora: Prof^a Dr^a Maria do Carmo Vieira

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a Silvia Aparecida Oesterreich

DOURADOS

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

M541a Menegati, Sara Emilia Lima Tolouei.
Avaliação da atividade antioxidante e dos perfis toxicológico e genotóxico do extrato aquoso das folhas de *Alibertia edulis* (Rich.) A. Rich. ex DC. / Sara Emília Lima Tolouei Menegati. – Dourados, MS : UFGD, 2016.
70f.

Orientadora: Prof. Dra. Maria do Carmo Vieira.
Dissertação (Mestrado em Biologia) – Universidade Federal da Grande Dourados.

1. Marmelo do Cerrado. 2. Toxicidade genética. 3. DL50. 4. Toxicidade aguda. 5. Toxicidade subcrônica. 6. Genotoxicidade. I. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central – UFGD.

©Todos os direitos reservados. Permitido a publicação parcial desde que citada a fonte.

"AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E DOS PERFIS TOXICOLÓGICO E GENOTÓXICO DO EXTRATO AQUOSO DAS FOLHAS DE *Alibertia edulis* (Rich) A. Rich ex DC".

POR

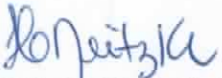
SARA EMILIA LIMA TOLOUEI MENEGATI

DISSERTAÇÃO APRESENTADA À UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS (UFGD), COMO PARTE DOS REQUISITOS EXIGIDOS PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM BIOLOGIA GERAL - ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: "BIOPROSPECÇÃO".


PROF^a. DR^a. MARIA DO CARMO VIEIRA
ORIENTADORA – UFGD


PROF^a. DR^a. PRISCILA NEDER MORATO
MEMBRO TITULAR – UEMS


PROF^a. DR^a. VIRGINIA DEMARCHI KAPPEL TRICHEZ
MEMBRO TITULAR – UFGD


PROF^a. DR^a. HERINTHA COETO NEITZKE-ABREU
MEMBRO TITULAR – UFGD

Aprovado em 30 de novembro de 2016.

SUMÁRIO

Lista de Figuras.....	v
Resumo.....	vi
Abstract.....	vii
1. INTRODUÇÃO.....	08
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	09
2.1. Bioma Cerrado.....	09
2.2. Plantas medicinais.....	09
2.3. <i>Alibertia edulis</i> (Rich.) A. Rich. ex DC.....	10
2.4. Estudos toxicológicos.....	12
2.4.1. Ensaio pré-clínicos.....	12
2.4.1.1 Toxicidade aguda.....	12
2.4.1.2. Toxicidade subcrônica.....	14
2.4.2. Ensaio de genotoxicidade.....	16
2.4.2.1. Teste de micronúcleo.....	17
2.4.2.2. Ensaio cometa.....	18
3. OBJETIVOS.....	20
4. REFERÊNCIAS.....	21
5. ARTIGOS COMPLETOS.....	27
5.1 Artigo publicado no periódico Journal of Ethnopharmacology.....	27
5.2 Artigo submetido para periódico Mutation Research Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis.....	47
6. CONCLUSÕES GERAIS.....	67
7. ANEXOS.....	68
Anexo 1 - Carta de aceite do periódico Journal of Ethnopharmacology.....	68
Anexo 2 - Carta de submissão ao periódico Mutation Research Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis.....	69
Anexo 3 - Parecer da Comissão de Ética em Uso de Animais.....	70

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Vista geral da árvore de <i>A. edulis</i> (Fonte: Arquivo pessoal, 2014).....	11
Figura 2. Flores e frutos de <i>A. edulis</i> (Fonte: Arquivo pessoal, 2014).....	11
Figura 3. Rato albino <i>Wistar</i> (Fonte: Arquivo pessoal, 2016).....	14
Figura 4. Imobilização do rato através do desprendimento da prega dorso-cervical para receber gavagem com o auxílio de uma cânula específica e seringa de 1 mL (Fonte: Arquivo pessoal, 2016).....	14

RESUMO

Alibertia edulis, popularmente conhecida como “marmelo do Cerrado”, é uma planta do Cerrado com grande potencial medicinal e alimentício. O chá das folhas é utilizado na medicina popular por apresentar efeito hipoglicemiante, diurético, calmante e anti-hipertensivo. Visto que não há relatos na literatura que comprovem sua toxicidade em ratos, o presente estudo teve como objetivo avaliar o perfil antioxidante, toxicológico e genotóxico do extrato aquoso das folhas de *A. edulis* (EAAE). Foram feitos testes de toxicidade pré-clínicos (toxicidade aguda e subcrônica) e genotóxicos (ensaio de cometa e teste de micronúcleo) utilizando ratos e ratas da linhagem *Wistar*. Na toxicidade aguda, os animais receberam uma única dose de 2000 mg/kg do EAAE e foram observados por 14 dias. Na toxicidade subcrônica, teste de cometa e micronúcleo, os animais receberam doses de 125, 250, 500 e 1000 mg/kg do EAAE por 28 dias consecutivos. Os resultados obtidos mostraram que o EAAE não provocou alterações comportamentais, hemato-bioquímicas, bem como alterações macroscópicas e histológicas de órgãos-alvos dos animais testados. A dose-letal média foi estabelecida como maior que 2000 mg/kg. Nos testes de genotoxicidade, o EAAE não provocou danos ao DNA nas células de sangue dos animais, quando comparados ao controle negativo. Desta forma, conclui-se que o EAAE não apresentou efeitos tóxicos em ratos e ratas após exposição aguda e subcrônica. Porém, estudos mais aprofundados (toxicidade reprodutiva) devem ser realizados de modo a garantir a segurança e eficácia do uso de *A. edulis* e proceder para estudos clínicos.

Palavras-chave: marmelo do Cerrado; toxicidade genética; DL50; toxicidade aguda; toxicidade subcrônica; genotoxicidade.

ABSTRACT

Alibertia edulis, popularly known as "marmelo do Cerrado", is a Cerrado plant with great medicinal and nutritional potential. The tea leaves are used in folk medicine as it presents hypoglycemic, diuretic, calming and anti-hypertensive effects. Since there are no reports in the literature showing its toxicity in rats, this study aimed to evaluate the antioxidant, toxicological and genotoxic profile of the aqueous extract of *A. edulis* leaves (AEAE). Pre-clinical (acute and subchronic toxicity) and genotoxicity tests (comet assay and micronucleus test) were performed using male and female Wistar rats. In acute toxicity, the animals received a single dose of 2000 mg/kg of the AEAE and were observed for 14 days. In subchronic toxicity, comet and micronucleus tests, the animals received doses of 125, 250, 500 and 1000 mg/kg of the AEAE for 28 consecutive days. The results showed that the AEAE caused no behavioral changes as well as no hemato-biochemical, gross and histological alterations of target organs of the animals tested. The lethal dose was established as greater than 2000 mg/kg. In genotoxicity tests, the AEAE did not cause DNA damage in the blood cells of the animals when compared to the negative control group. Thus, it is concluded that AEAE did not cause any toxic effects in male and female rats after acute and subchronic exposure. However, further studies (reproductive toxicity) should be performed to ensure the safety and efficacy of *A. edulis* and conduct to clinical studies.

Key-words: marmelo do Cerrado; genetic toxicology; LD50; acute toxicity; subchronic toxicity; genotoxicity.

1. INTRODUÇÃO

As plantas medicinais vêm sendo utilizadas há milhares de anos para o tratamento de diversas doenças. É por este motivo que as plantas têm se tornado o alvo de numerosos estudos científicos de modo a avaliar sua segurança, eficácia e validar seu uso tradicional (Alves et al., 2016).

Dentre os biomas do Brasil, está o Cerrado, que representa cerca de 23% da superfície do País (Neto & Moraes, 2003). A família Rubiaceae é a quarta maior das Angiospermas distribuídas no Cerrado e é considerada a sétima família mais rica em espécies (Mendonça et al. 2008; Barbosa et al., 2012). O gênero *Alibertia* possui um grande número de espécies com elevado potencial econômico e farmacológico visto que algumas possuem atividade antitumoral, citotóxica e antioxidante (Rocha, 2011; Mendonça et al., 2013).

Alibertia edulis (Rubiaceae), popularmente conhecida como “marmelo do Cerrado”, é uma planta amplamente distribuída no Cerrado brasileiro. Tem potencial medicinal e seus frutos são uma importante fonte de alimento para a população local (Almeida et al., 1998; Marin, 2006). O potencial farmacológico de *A. edulis* vem sendo estudado devido à presença de compostos triterpenicos em suas folhas (Cronquist, 1981; Brochini et al., 1994). Na medicina popular, o chá das folhas é utilizado por apresentar efeito hipoglicemiante, diurético, calmante e anti-hipertensivo (Rieder, 2013; Marques et al., 2013).

A busca por tratamentos à base de plantas medicinais tem aumentado devido à crença de que o natural está isento de efeitos tóxicos. Porém, sabe-se que as plantas possuem compostos que podem ser altamente tóxicos, podendo levar à morte (Konan et al., 2006). Por esta razão, é de suma importância que o potencial toxicológico das plantas medicinais seja avaliado de acordo com os protocolos elaborados por agências reguladoras como a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e Organisation for Economic Cooperation and Development (OECD).

Embora o chá das folhas de *A. edulis* seja popularmente utilizado por apresentar diversos efeitos benéficos, não há relatos na literatura que comprovem sua toxicidade. Desta forma, o presente trabalho teve por objetivo avaliar o perfil toxicológico e genotóxico em modelos experimentais.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Bioma Cerrado

O bioma Cerrado é o segundo maior em área do Brasil, ocupando 22,0% do território brasileiro e apresentando características únicas como tipo de solo e clima que afetam diretamente o desenvolvimento das plantas (Neto e Morais, 2003). O Cerrado brasileiro percorre 14 estados, sendo Centro-Oeste a região de maior predominância (Roesler et al., 2007; Ribeiro & Walter, 2008). Faz fronteira com o Pantanal, Caatinga, Amazônia e Mata Atlântica. É formado por espécies arbóreas, arbustos e gramíneas. O clima é composto por uma estação quente e seca e outra úmida e chuvosa, sendo semelhante a regiões savânicas do mundo. Os solos de grande parte das áreas do Cerrado são distróficos, com baixo pH, baixa disponibilidade de cálcio e de magnésio e alto teor de alumínio (Furley e Ratter, 1988; Ibama, 2008).

Existem aproximadamente 6.500 espécies de plantas nativas no Cerrado, das quais, apenas cerca de 200 já têm algum uso econômico identificado devido à sua composição em moléculas com importantes princípios ativos, úteis para o tratamento e cura de numerosas doenças. Contudo, o Cerrado figura na relação dos 17 ecossistemas mais degradados do planeta, sendo um dos “hot spots” mundiais de biodiversidade e foi incluído dentre os biomas prioritários para a conservação em nível global (Durigan et al., 2007).

Dentre as famílias distribuídas no Cerrado encontra-se a Rubiaceae, que tem distribuição predominantemente tropical e subtropical e é constituída de espécies lenhosas, herbáceas e arbustivas. Os gêneros *Alibertia*, *Psychotria*, *Palicourea* e *Tocoyena* são os que detêm maior número de espécies com diversas utilidades de importância econômica e farmacêutica (Da Silva, 2013, Mendonça et al., 2013). Algumas espécies, como *Alibertia sessilis* e *A. myrciifolia*, apresentarem atividades biológicas como antitumoral, antioxidante e citotóxica (Gupta et al., 1996; Rocha, 2011).

2.2 Plantas medicinais

As plantas medicinais são utilizadas mundialmente por serem uma importante fonte para novas drogas. O uso dos extratos de plantas é uma prática que vem sendo realizada desde os primórdios no tratamento e na cura de enfermidades (Martins & Garlet,

2016). Com o intuito de buscar soluções para suas necessidades básicas como alimentação, procriação, proteção e cura de doenças, o homem primitivo passou a utilizar as plantas medicinais de diversas formas. Registros mostram que os povos Babilônicos e Suméricos (2.600 a.C.) utilizavam diversas partes das plantas em remédios. O imperador chinês Shen-nung descreveu 365 drogas no 1º Pen T'são, sendo considerado pioneiro da medicina oriental (Parky, 1966).

As primeiras descobertas sobre as plantas medicinais foram realizadas a partir de observações minuciosas de pessoas que haviam ingerido alguma planta medicinal para fim terapêutico. A partir dessas observações, percebeu-se que as moléculas bioativas, além de serem benéficas e promoverem o tratamento e cura de doenças, muitas vezes poderiam ser tóxicas, podendo provocar diversas reações adversas e até a morte (Stone, 2008).

O Brasil é o País com a maior biodiversidade do planeta, possuindo cerca de 20% das espécies da flora mundial (Melo et al., 2011). Visto que a busca por medicamentos naturais está se intensificando, as plantas medicinais se tornaram o foco de numerosos estudos de modo a avaliar sua segurança, eficácia e validar seu uso tradicional (Matta et al., 2011). Por essa razão, o Cerrado brasileiro tem sido o foco de numerosos estudos já que é o segundo maior bioma em área do País (Neto e Morais, 2003).

2.3 *Alibertia edulis* (Rich.) A. Rich. ex DC.

O gênero *Alibertia* possui uma rica constituição terpenoídica, sendo fontes de triterpenos pentacíclicos, especialmente do tipo oleanano e ursano (Bolzani et al., 1991; Brochini et al., 1994; Luciano et al., 2004). Em estudos realizados com *Alibertia sessilis* e *Alibertia myrciifolia* foram isolados iridóides glicosilados, flavonol glicosilado, flavonas e cumarinas (Luciano et al., 2004; Silva et al., 2008).

A *Alibertia edulis* possui diversos nomes populares, sendo comumente conhecida como marmelão (Young et al., 1992), marmelada bola (Da Silva et al., 2008) e marmelo do Cerrado. É uma espécie arbórea de pequeno porte com copa irregular, belas folhagens (Figura 1), flores brancas e fruto baga de polpa endurecida quando madura (Figura 2). Possui grande potencial como planta ornamental e seus frutos são uma importante fonte de alimento para a população local (Lorenzi, 2009).



Figura 1. Vista geral da árvore de *Alibertia edulis* (Fonte: Arquivo pessoal, 2014).



Figura 2. Flores e frutos de *Alibertia edulis* (Fonte: Arquivo pessoal, 2014).

Popularmente, o chá das folhas é utilizado por apresentar efeito hipoglicemiante, calmante e hipotensor (Marques et al., 2013; Neto, 2006; Rieder, 2013). A *A. edulis* tem sido estudada do ponto de vista químico e farmacológico, pela presença de compostos triterpênicos nas folhas (Brochini et al., 1994) e pelo seu potencial hipoglicemiante, anti-hipertensivo, diurético e antitumoral.

Uma investigação fitoquímica com as hastes de *A. edulis* conduziu ao isolamento e identificação de um novo éster iridóide e uma nova saponina, que apresentaram atividades inibitórias moderadas contra *Candida albicans* e *C. krusei* em um ensaio de diluição (Silva et al., 2008). Identificou-se também a presença de um oleanano (Brochini, 1994), de alcaloides e taninos, que podem estar envolvidos com as atividades biológicas evidenciadas (Soto-Sobenis et al., 2001; Da Silva et al., 2010), como também atividades tóxicas no caso dos alcaloides. Além disso, a espécie apresentou elevado potencial antioxidante devido à presença de compostos fenólicos (Coe et al., 2010). Plantas medicinais com atividade antioxidante são de suma importância em toxicologia genética, uma vez que espécies reativas podem causar danos ao DNA. Por esta razão, a utilização de antioxidantes é associada a potenciais efeitos anticâncer, uma vez que protege o DNA contra a ação de radicais livres e pode prevenir ou retardar o aparecimento de alguns tipos de câncer (Diplock, 1994; Totter, 1980; Hudecová et al., 2012).

2.4 Estudos toxicológicos

2.4.1 Ensaios pré-clínicos

O uso das plantas com finalidade de prevenir, aliviar ou curar enfermidades tem sido realizado por muitos anos. As plantas medicinais são uma importante fonte para a descoberta de novas drogas, visto que possuem grande variedade de compostos com efeitos biológicos (Martins & Garlet, 2016). Ao serem processadas para a obtenção de medicamento, tem-se como resultado o medicamento fitoterápico (Chevallier, 2016). Entretanto, ensaios pré-clínicos devem ser realizados a partir de guias publicados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA de modo a garantir a segurança e eficácia das substâncias em estudo (ANVISA, 2013).

A busca por tratamentos à base de plantas medicinais tem aumentado devido à crença de que o natural está isento de efeitos tóxicos. Porém, sabe-se que as plantas possuem compostos que podem ser altamente tóxicos, podendo levar à morte (Konan et al., 2006). Estudos realizados com a *Aloe vera L.* e *Stryphnodendron adstringens* apontam que essas espécies possuem elevada toxicidade quando testadas em mamíferos (Parra et al., 2001; Rebecca et al., 2002). Desta forma, os estudos toxicológicos são de suma importância para avaliar os níveis de toxicidade e efeitos adversos associados ao consumo de plantas medicinais (Stone, 2008).

Os testes para avaliação de toxicidade das substâncias químicas estão estabelecidos nos protocolos da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), intitulado “Guia para a Condução de Estudos não clínicos de Toxicologia e Segurança Farmacológica necessários ao Desenvolvimento de Medicamentos” e através dos protocolos estabelecidos pela Organisation for Economic Cooperation and Development (OECD), guias 425 e 407. Tais testes, quando desenvolvidos corretamente, avaliam profundamente o perfil toxicológico de substâncias e permitem que estudos clínicos sejam desenvolvidos.

2.4.1.1 Toxicidade Aguda

O estudo de toxicidade aguda tem como objetivo avaliar a toxicidade produzida por determinada substância após administração de uma ou mais doses durante período não superior a 24 horas e determinar a dose letal média (DL50), seguido de observação

dos animais por 14 dias após a administração. O cálculo da DL50 é realizado com base nos resultados obtidos nos testes e seu valor é expresso em termos de peso da substância teste por unidade de peso do animal testado (mg/kg). A DL50 será considerada maior que 2000 mg/kg, caso três ou mais animais testados sobrevivam. Esses estudos permitem observar a ocorrência de mortalidade e de sinais tóxicos em órgãos-alvos dos animais (OECD, 2008a).

Todos os procedimentos devem estar em conformidade com os padrões locais de cuidados com animais de laboratório. Os animais devem ser mantidos em biotério específico para sua linhagem com ciclo claro/escuro de 12 horas, temperatura de $22^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ e umidade de 30-70% controladas, água potável e ração comercial. Os animais devem ser engaiolados em grupo e devem ser alojados, por gaiola, até cinco animais (OECD, 2008a).

Diversas espécies de roedores podem ser utilizadas, entretanto, prefere-se o uso de ratos (Figura 3). Na toxicidade aguda, recomenda-se a utilização de ratas, visto que a literatura aponta maior sensibilidade delas aos compostos testados. Porém, quando houver informação adequada que indique que os machos são mais sensíveis, eles devem substituir as fêmeas no teste. Os animais utilizados devem ser jovens adultos, saudáveis, nulíparas e não-prenhas. No início do estudo, a variação de peso dos animais não deve exceder $\pm 20\%$ do peso médio para cada sexo (OECD 2008a).

A via de administração da substância teste deve ser a pretendida para administração em humanos. No caso da via pretendida ser oral, preconiza-se a administração da substância teste via gavagem (Figura 4) (OECD, 2008a). A escolha da dose deve basear-se em informações relevantes quanto à toxicidade da substância teste. Caso a substância teste não possua indícios de eventos tóxicos, inicia-se o estudo com a dose limite de 2000 mg/kg, a qual deve ser administrada a um único animal a ser cuidadosamente observado nas primeiras 48 horas. Caso o animal sobreviva, a mesma dose deve ser administrada sequencialmente a mais quatro ratas em intervalos de 48 horas. Em situações em que um ou até três animais morram durante o tratamento, doses mais baixas devem ser testadas de modo a estabelecer a DL50 (OECD, 2008a).



Figura 3. Rato albino *Wistar* (Fonte: Arquivo pessoal, 2016).



Figura 4. Imobilização do rato através do desprendimento da prega dorso-cervical para receber gavagem com o auxílio de uma cânula específica e seringa de 1 mL (Fonte: Arquivo pessoal, 2016).

Todos os animais devem ser observados diariamente por 14 dias, preferivelmente no mesmo horário. Durante o período de observação, o peso corporal, consumo de água, ração e comportamento dos animais devem ser observados e anotados (OECD, 2008a). O comportamento deve ser avaliado de acordo com os parâmetros de Hipócrates, segundo Malone & Robichaud (1962), em que o estado de consciência, coordenação do sistema motor e tônus muscular, reflexos, atividade do sistema nervoso central e autônomo são observados (OECD, 2008a).

Ao final do período de observação, os animais sobreviventes devem ser submetidos à eutanásia por meio de um método químico e físico. Os órgãos vitais devem ser cuidadosamente removidos e avaliados macroscopicamente (Figura 5). Caso alterações macroscópicas sejam observadas, devem ser realizados estudos histopatológicos dos órgãos acometidos (ANVISA, 2004; OECD, 2008a).

2.4.1.2 Toxicidade Subcrônica

O ensaio de toxicidade subcrônica é utilizado na avaliação das características tóxicas de uma substância química através da administração de doses repetidas da substância teste. É realizada após a obtenção de dados iniciais do seu perfil toxicológico a partir da toxicidade aguda. Este teste fornece informações sobre os perigos da exposição repetida de uma substância, incluindo efeitos sobre o sistema nervoso, imunológico e endócrino. Também fornece dados sobre substâncias que afetam os órgãos reprodutores masculinos e femininos em animais adultos e jovens (OECD, 2008b).

Os dados de segurança obtidos na avaliação subcrônica de determinada substância dão suporte às Fases 1, 2 e 3 da Pesquisa Clínica (ANVISA, 2013). É um teste muito bem aceito e reproduzido no meio científico, visto que avalia alvos sensíveis à toxicidade, como o sistema hematopoiético, através de análises hematológicas; tecidos, através de avaliações bioquímicas; aspectos fisiológicos dos animais, a partir da avaliação relativa dos órgãos vitais e reprodutivos bem como a presença de patologias a partir de análises histopatológicas. Além disso, promove informações sobre a indicação da dose de efeito não observado (NOEL), dose de efeito adverso não observado (NOAEL), menor dose com efeito adverso observado (LOAEL) e menor dose com efeito observado (LOEL) (OECD, 2008b; ANVISA 2013).

Assim como no ensaio de toxicidade aguda, prefere-se a utilização de ratos embora outras espécies de roedores também possam ser utilizadas sob justificativa (OECD, 2008b). A via de administração escolhida também deve ser pretendida para administração em humanos (ANVISA, 2013) e os grupos amostrais devem ser compostos por pelo menos dez animais, sendo cinco fêmeas e cinco machos, jovens e saudáveis.

Os grupos experimentais devem ser compostos por cinco machos e cinco fêmeas. Um grupo denominado controle negativo, o qual receberá o veículo utilizado no preparo da substância teste, deve ser estabelecido e avaliado de forma idêntica aos animais pertencentes aos grupos tratados (OECD, 2008b; ANVISA, 2013). Um grupo denominado satélite, o qual também receberá a maior dose da substância em estudo, deve ser estabelecido e tratado por 28 dias. Entretanto, a partir do 29º dia, esse grupo permanecerá sob observação por mais 14 dias a fim de observar efeitos de reversibilidade, persistência ou ocorrência de efeitos tóxicos tardios.

A escolha das doses é baseada em informações obtidas no ensaio de toxicidade aguda. No mínimo três doses devem ser testadas, sendo 1000 mg/kg/dia a dose máxima permitida. A dose máxima deve ser aplicada de modo a induzir efeitos tóxico, porém sem causar morte ou sofrimento aos animais. As demais doses são estabelecidas em sequência decrescente com vista a evidenciar uma correlação entre dosagem e efeitos não adversos observáveis. A dose mais elevada deve ser escolhida com o objetivo de induzir efeitos tóxicos, mas não a morte ou sofrimento grave no animal (OECD, 2008b).

As doses devem ser administradas diariamente por 28 dias consecutivos. O período de observação deve ser de 28 dias, com exceção do grupo satélite que será mantido por mais 14 dias, sem tratamento, conforme mencionado anteriormente. As observações clínicas gerais devem ser feitas pelo menos uma vez por dia, de preferência

no mesmo horário, considerando o período de pico de efeitos previsíveis após a administração. O consumo de ração e água bem como o peso dos animais devem ser avaliados, pelo menos, uma vez por semana. Já o comportamento dos animais deve ser diariamente observado de acordo com o screening hipocrático citado anteriormente no teste de toxicidade aguda (Malone & Robichaud, 1962; OECD, 2008a).

Ao final do período de observação, todos os animais devem ser submetidos à eutanásia através de um método químico e físico. Amostras de sangue devem ser coletadas para avaliações hematológicas e bioquímicas. Os órgãos vitais devem ser cuidadosamente removidos, avaliados macroscopicamente e submetidos para avaliação histopatológica.

Visto que o sistema hematopoiético é alvo de substâncias tóxicas, os seguintes parâmetros hematológicos devem ser avaliados: hematócrito, concentração de hemoglobina, contagem de eritrócitos, contagem total e diferencial de leucócitos e contagem de plaquetas. De modo a avaliar os possíveis efeitos tóxicos nos tecidos, os seguintes parâmetros bioquímicos devem ser avaliados: sódio, potássio, glicose, colesterol total, ureia, creatinina, proteínas totais, albumina, cálcio, triglicerídeos, gama-glutamyltranspeptidase (GGT), alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) e fosfatase alcalina (FAL). As amostras de sangue devem ser realizadas imediatamente antes ou como parte do processo de eutanásia dos animais e armazenado em condições apropriadas (OECD, 2008b; Traesel, 2014).

Recomenda-se a avaliação dos órgãos vitais (coração, pulmão, fígado, baço, rins) e reprodutivos (testículos, epidídimos, ovários e úteros). Os órgãos devem ser cuidadosamente removidos, limpos de tecidos aderentes, pesados e encaminhados para análise histopatológica (OECD, 2008b). Após o período de observação de efeitos reversíveis ou tardios da substância teste no grupo satélite, o mesmo procedimento de eutanásia, coleta de amostras de sangue e avaliação macro e microscópica dos órgãos deve ser realizada.

2.4.2 Ensaios de Genotoxicidade

A evidência de que agentes químicos, físicos e biológicos possam interagir com o material genético, resultando em mutações associadas à instabilidade genômica e ao câncer, já se fazia possível antes mesmo da descrição estrutural do DNA (Beale, 1993; Mallng, 2004). Nos anos 80, a genotoxicidade foi desenvolvida de modo a avaliar a

segurança dos medicamentos quanto à sua mutagenicidade (Doll & Peto, 1981). Por essa razão, agências reguladoras como a ANVISA, OECD e Food and Drug Administration (FDA) passaram a exigir os testes de genotoxicidade como parte essencial da validação de medicamentos (Hartmann, 2004).

Também conhecida como toxicologia genética, a genotoxicidade tem o potencial de detectar substâncias nocivas ao material genético, ou seja, moléculas que causam mutação gênica, dano cromossômico ou lesão no DNA (FDA, 2008; ANVISA, 2013). Também é frequentemente utilizada para medir um evento inicial ou intermediário da tumorigênese (Ribeiro, Salvadori & Marques, 2003). Portanto, os ensaios de genotoxicidade devem ser aplicados na avaliação do potencial toxicológico de qualquer substância utilizada por humanos, seja de origem química ou natural, especialmente quando houver indicação de uso contínuo ou prolongado (OECD, 2014a).

O ensaio cometa e o teste de micronúcleo são testes de genotoxicidade disponíveis que, quando associados, promovem uma avaliação altamente sensível que permite detectar, de maneira simples, lesões nas fitas de DNA bem como avaliar presença ou ausência de danos causados por uma substância nos cromossomos e/ou aparelho mitótico dos eritroblastos (OECD, 2014a; Araldi et al., 2015).

2.4.2.1 Teste de Micronúcleo

O teste de micronúcleo, também conhecido como Howell-Jolly Bodies, é um ensaio amplamente utilizado na detecção de danos citogenéticos em populações expostas à agentes genotóxicos. O termo micronúcleo está relacionado aos fragmentos acêntricos expelidos do núcleo principal nos estágios tardios da anáfase (Samanta & Dey, 2012; Araldi et al., 2015)

Esse ensaio *in vivo* é especialmente relevante para avaliar a genotoxicidade, porque, embora possam variar entre as espécies, os fatores do metabolismo *in vivo*, farmacocinética e dos processos de reparação do DNA são ativos e contribuem para as respostas. O teste avalia danos a formação de eritrócitos micronucleados, tanto na medula óssea como em células de sangue periférico de animais. Esses micronúcleos representam perda da cromatina e podem conter fragmentos de cromossomo ou cromossomos inteiros (OECD, 2014a).

Quando um dos eritroblastos da medula óssea converte-se em eritrócito policromático ou reticulócito, o núcleo da célula é expulso. Porém, qualquer micronúcleo

que tenha sido formado pode permanecer no citoplasma. A visualização de micronúcleos é facilitada nestas células, porque lhes falta um núcleo principal. Um aumento na frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados em animais tratados é uma indicação de dano cromossômico induzido (OECD, 2014a).

Os eritrócitos policromáticos são originados após o núcleo ser expelido pelo eritroblasto. Tais células contêm RNA no citoplasma detectável pelo corante Giemsa, o qual é utilizado na última etapa do preparo das lâminas antes da leitura microscópica. Já os eritrócitos policromáticos que sofrem maturação são passíveis de identificação, visto que apresentam uma coloração alaranjada após também serem coradas com Giemsa. Desta forma, agentes clastogênicos e/ou aneugênicos são capazes de formar fragmentos cromossômicos durante a divisão celular que não estão integradas no núcleo da célula filha, dando origem aos MCNs (Mavournin et al., 1990; Araldi et al., 2015).

A medula de roedores adultos jovens é o tecido alvo para dano genético neste teste uma vez que os eritrócitos são produzidos neste tecido. A medição de micronúcleos em eritrócitos policromáticos no sangue periférico é aceitável em outras espécies de mamíferos mediante justificativa. Os animais são expostos à substância teste através de uma via apropriada. A frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados é o foco principal deste teste. Se há evidências de que a substância de teste não vai atingir os tecidos alvos, a aplicação deste teste faz-se desnecessária (OECD, 2014a).

Qualquer mamífero pode ser utilizado neste teste, porém, recomenda-se o uso de ratos ou camundongos. Os animais devem ser divididos em grupos contendo, no mínimo, cinco animais de cada sexo. Grupos de controle positivo e negativo de ambos os sexos devem ser incluídos no estudo (OECD, 1997; OECD, 2014a).

Na busca de células imaturas micronucleadas, um mínimo de 2000 células por animal deve ser avaliado. A percentagem de eritrócitos policromáticos no total de eritrócitos também pode ser determinada, utilizando esses valores como mais um parâmetro de toxicidade (ANVISA, 2010; Traesel, 2014).

2.4.2.2 Ensaio Cometa

Também conhecido como corrida de células únicas em gel de eletroforese (SCGE), o Ensaio Cometa é utilizado para a detecção de lesões nas cadeias de DNA em células ou núcleos isolados a partir de vários tecidos de animais, geralmente roedores, que tenham sido expostos a materiais com potencial genotóxico. Realizado em condições

alcalinas ($\text{pH} > 13$), o teste do Cometa pode detectar quebras de cadeia simples e dupla. Estas rupturas dos filamentos podem ser reparadas, letais para a célula ou pode ser fixo em uma mutação que resulte numa alteração permanente. Eles também podem conduzir a lesões cromossômicas que também estão associadas a diversas doenças humanas, incluindo o câncer (OECD, 2014b; Traesel, 2014).

O teste Cometa detecta lesões genômicas que, após serem processadas, podem resultar em mutação. É um teste utilizado também para estudos de reparo do DNA visto que essas lesões detectadas pelo teste do Cometa são passíveis de correção (Ribeiro, Salvadori & Marques, 2003 *apud* Traesel, 2014). É uma técnica que necessita de apenas uma pequena quantidade de células para a análise e pode ser aplicada em qualquer órgão e tecido de diversos organismos vivos (Rojas, Lopez & Valverde, 1999).

Quando esfregaços de células obtidas por punção caudal são embebidos em agarose, suas membranas são lisadas e suas proteínas nucleares extraídas. O DNA então ocupará o espaço (nucleóide) no gel anteriormente preenchido por toda a célula. Caso existam lesões na molécula de DNA, os fragmentos clivados podem ser observados após a aplicação de uma corrente elétrica (Cook & Brazel, 1976; Traesel, 2014). Os fragmentos que são transportados para fora da nucleoide, pela eletroforese, resultam em uma imagem semelhante a um cometa, com a presença de uma cabeça e cauda. Os cometas em células são classificados em Classe 0, sendo as células com ausência de danos ao DNA; Classe 1, danos ao DNA em fase inicial; Classe 2, danos ao DNA em fase intermediária e Classe 3, danos ao DNA de maior intensidade (Freitas, 2007; Araldi et al., 2015).

Sabe-se que não existe célula sem lesões, visto que o próprio metabolismo celular gera lesões diárias no DNA/célula. Desta forma, é de suma importância que grupos controles positivo e negativo sejam estabelecidos, visto que o teste do cometa é essencialmente comparativo (Ribeiro, Salvadori & Marques, 2003; Traesel, 2014).

Visto que diversas drogas testadas demonstraram elevado potencial genotóxico, o ensaio Cometa foi adotado como parte dos testes de validação de novos medicamentos por indústrias farmacêuticas. Além disso, é um teste altamente recomendado por agências regulatórias como FDA, OECD e ANVISA devido à sua elevada sensibilidade (Hobbs et al., 2012; Araldi et al., 2015).

3. OBJETIVOS GERAL E ESPECÍFICOS

Geral

- Avaliar a atividade antioxidante e os perfis toxicológico e genotóxico do extrato aquoso de folhas de *Alibertia edulis*.

Específicos

- Avaliar a atividade antioxidante do extrato aquoso das folhas pelo método DPPH e ABTS;
- Realizar uma triagem fitoquímica do extrato aquoso das folhas;
- Avaliar o espectro toxicológico do extrato aquoso das folhas em modelo animal após administração aguda e subcrônica;
- Determinar a dose letal média (DL50) do extrato após exposição aguda;
- Avaliar os parâmetros comportamentais, fisiológicos, hematológicos, bioquímicos e histopatológicos nos animais tratados com o extrato aquoso;
- Investigar o potencial mutagênico do extrato aquoso em células de ratos *Wistar* pelo Teste do Micronúcleo;
- Investigar o potencial citotóxico do extrato aquoso em células de ratos *Wistar* pelo Teste do Micronúcleo em medula óssea femoral;
- Investigar o potencial genotóxico do extrato aquoso em células de ratos *Wistar* através do Ensaio Cometa.

4. REFERÊNCIAS

Almeida, S. P., Proença, C. E. B., Sano, S. M., Ribeiro, J. F. **Cerrado: espécies vegetais úteis**. EMBRAPA, Brasília, 1998.

Alves, A. A., Reis, B. M. V., Pereira, E. M. L., Branco, N. de M., Saluma, T. G. B., Bento, L. M. A. Popular Medicine and Diabetes Mellitus Type 1: a Treatment Perspective through Lobeira's fruit. **Ensaio e Ciência: Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde**, v. 20, n. 1, p. 38-42, 2016.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. **Institui e normatiza o registro de produtos fitoterápicos junto ao Sistema de Vigilância Sanitária**. Portaria nº 6. Brasília, 31 de janeiro de 1995.

Agência Nacional De Vigilância Sanitária - ANVISA. **Guia para a realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos**. Resolução - RE nº 90. Brasília, 16 de março de 2004.

Agência Nacional De Vigilância Sanitária - ANVISA. **Esclarecimento sobre o "Parágrafo 26" do Protocolo OECD 474 - Teste de Micronúcleo em Eritrócitos de Mamíferos**. Brasília, 16 de agosto de 2010.

Agência Nacional De Vigilância Sanitária – ANVISA. Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos. Brasília, 31 de janeiro de 2013.

Araldi, R. P., Melo, T. C., Mendes, T. B., Junior, P. L. S., Nozima, B. H. N., Ito, E. T., Carvalho, R. F., Souza, E. B., Stocco, R. de C. Using the comet and micronucleus assays for genotoxicity studies: A review. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 72, p. 74-82, 2015.

Barbosa, M. R., Zappi, D., Taylor, C., Cabral, E., Jardim, J.G., Pereira, M. S., Calió, M. F., Pessoa, M. C. R., Salas, R., Souza, E. B., Di maio, F. R., Macias, L., Anunciação, E. A., Germano filho, P. & Oliveira, J. A. Rubiaceae. *In*: Forzza, R.C. *et al.* (org.). **Lista de espécies da flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2012. Disponível em <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB000210>>. Acesso em 18 de ago 2016.

Beale, G. The discovery of mustard gas mutagenesis by Auerbach and Robson in 1941. **Genetics**, v. 134, p. 393-399, 1993.

Brochini, C. B., Martins, D., Roque, N. F. An oleanane acid from *Alibertia edulis*. **Phytochemistry**, v. 36, p. 1291-1295, 1994.

Coe, F. G., Parikh, D. M., Johnson, C. A. Alkaloid presence and brine shrimp (*Artemia salina*) bioassay of medicinal species of eastern Nicaragua. **Pharmaceutical biology**, v. 48 n. 4, p. 439-445, 2010.

Cook, P. R.; Brazel, I. A. Conformational constraints in nuclear DNA. **Journal of Cell Science**, v. 22, p. 287-302, 1976.

Chevallier, A. **Encyclopedia of herbal medicine**. Ed DK Publishing, New York. Third American Edition, 2016.

Cronquist, A. **An integrated system of flowering plants**. New York: Columbia University Press, 1262 p. il, 1981.

Da silva, M. A. P. Aspectos etnobotânicos, fitoquímicos e farmacológicos de espécies de Rubiaceae no Brasil. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 18, n. 1, p. 140-156, 2013.

Deng, Y. X., Cao, M., Shi, D. X., Yin, Z. Q., Jia, R. Y., Xu, J., Wang, C., Lv, C., Liang, X. X., He, C. L., Yang, Z. R., Zhao, J. Toxicological evaluation of neem (*Azadirachta indica*) oil: acute and subacute toxicity. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 35, p. 240-246, 2013.

Diplock, A. T. Antioxidants and diseases prevention. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 15, p. 293-376, 1994.

Doll, R.; Peto, R. The causes of câncer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. **Journal of National Cancer Institute**, v. 66, p. 1191-1308, 1981.

Durigan, G.; Siqueira, M. F. D.; Franco, G. A. D. C. Threats to the Cerrado remnants of the State of São Paulo, Brazil. **Scientia Agrícola**, v. 64, n. 4, p. 355-363, 2007.

Food and Drug Administration – FDA. **Guidance for industry impurities in drug substances and products: recommended approaches**, 2008.

Freitas, P. S. **Investigação do Potencial Mutagênico do extrato de frutos de *Vacciniumcorymbosum* (Mirtilo) em células do sangue periférico de camundongos Swiss in vivo**. Dissertação (Mestrado) - Universidade José do Rosário Vellano - Alfenas, Minas Gerais, 2007.

Furley, P. A., Ratter, J. A. Soil resources and plant communities of the Central Brazilian cerrado and their development. **Journal of Biogeography**, 15, 97-108, 1988.

Gomes, M. R. F., Schuh, R. S., Jacques, A. L. B., Dorneles, G. G., Montanha, J., Roehle, P. M., Bordignon, S., Dallegrove, E., Leal, M. B., Limberger, R. P. Biological assessment (antiviral and antioxidant) and acute toxicity of essential oils from *Drimys angustifolia* and *D. brasiliensis*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 23, n. 2, p. 284-290, 2013.

Gupta, M. P. ; Monge, A.; Karakas, G. A.; Lopes, C; Solis, P. N.; Leon, E.; Tujillo, M.; Suarez, O.; Wilson, F.; Montenegro, G.; Noriega, Y.; Klaude, M.; Eriksson, S.; Nigren, J.; Ahnstrom, G. The comet assay: Mechanisms and technical considerations. **Mutation Research**, v. 363, n. 2, p. 89-96, 1996.

Hartmann, A. Use of the alkaline in vivo Comet assay for mechanistic genotoxicity Investigations. **Mutagenesis**, v. 19, p. 51–59, 2004.

Hobbs, C., Swartz, C., Maronpot, R., Davis, J., Recio, L., Hayashi, S. Evaluation of the genotoxicity of the food additive, gum ghatti, *Food and Chemical Toxicology*, v. 50, p. 854-860, 2012.

Hudecová, A., Kusznierevich, B., Rundén-Pran, E., Magdolenová, Z., Hasplová, K., Rinna, A., Fjellsbø, L. M., Kruszewski, M., Lankoff, A., Sandberg, W. J., Refsnes, M., Skuland, T., Schwarze, P., Brunborg, G., Bjøras, M., Collins, A., Miadoková, E., Gálová, E., Dusinská, M. Silver nanoparticles induce premutagenic DNA oxidation that can be prevented by phytochemicals from *Gentiana asclepiadea*. **Mutagenesis**, v. 27, p. 759-769, 2012.

Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis – IBAMA, 2008. Disponível em <http://www.ibama.gov.br>. Acesso em 19 ago 2016.

Konan, N. A., Bacchi, E. M., Lincopan, N., Varela, S. D., Varanda, E. A. Acute, subacute toxicity and genotoxic effect of a hydroethanolic extract of the cashew (*Anacardium occidentale* L.). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 110, p. 30-38, 2006.

Lorenzi, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**, v. 3, 1. Ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, v. 384, 2009.

Luciano, J. H. S.; Lima, M. A. S.; Souza, E. B.; Silveira, E. R. Chemical constituents of *Alibertia myrciifolia* Spruce ex K. Schum. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 32, n. 12, p. 1227-1229, 2004.

Malling, H. History of the science of mutagenesis from a personal perspective. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 44, p. 372-386, 2004.

Marin, A. M. F. **Potencial nutritivo de frutos do cerrado: composição em minerais e componentes não convencionais**, 121 f. [Dissertação - Mestrado]. Universidade de Brasília, 2006.

Marques, M. C. S., Hamerski, L., Garcez, F. R., Tieppo, C., Vasconcelos, M., Torres-Santos, E. C., Garcez, W. S. In vitro biological screening and evaluation of free radical scavenging activities of medicinal plants from the Brazilian Cerrado. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 7, n. 15, p. 957-962, 2013.

Martins, M. C. & Garlet, T. M. B. Desenvolvendo e divulgando o conhecimento sobre plantas medicinais. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, v. 20, n. 1, p.438-448, 2016.

Matta, C. B. B.; Souza, E. T.; Queiroz, A. C.; Lira, D. P.; Araújo, M. V.; Silva, L. H. A.; Miranda, G. E. C.; Junior, J. X. A.; Filho, J. M. B.; Santos, B. V. O.; Moreira, M. S. A. Antinociceptive and anti-inflammatory activity from Algae of the Genus *Caulerpa*. **Marine Drugs**, v. 9, p. 307-318, 2011.

Mavournin, K., Blakey, D., Cimino, M., Salamone, M., Heddle, J. The in vivo micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. **Mutation Research**, v. 239 p. 29-80, 1990.

Melo, J. G.; Santos, A. G.; Amorim, E. L.; Nascimento, S. C.; Albuquerque, U. P. Medicinal plants used as antitumor agents in Brazil: an ethnobotanical approach. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 14, 2011.

Mendonça, A. C. A. M.; Da silva, M. A. P.; Seixas, E. N. C.; Dos santos, M. A. F. Rubiaceae: aspectos ecológicos e reprodutivos. **Cadernos de Cultura e Ciência**, v. 12 n. 2, p. 8-20, 2012.

Mendonça, R. C., Felfili, J. M., Walter, B. M. T., Silva-Júnior, M. C., Rezende, A. V., Filgueiras, T. S., Nogueira, P. E. & Fagg, C. W. **Flora vascular do bioma Cerrado: checklist com 12.356 espécies**. Pp. 421-1279. In: Sano, S.M.; Almeida, S.P. & Ribeiro, J.F. (orgs.). Cerrado: ecologia e flora. Brasília, DF, EMBRAPA, 2008.

Neto, G.G., Morais, R.G. Recursos medicinais de espécies do cerrado de Mato Grosso: um estudo bibliográfico. **Acta Botânica Brasileira**, v. 17, n. 4, p. 561-84, 2003.

Neto, G.G. O saber tradicional pantaneiro: as plantas medicinais e a educação ambiental. **Revista eletrônica do mestrado em educação ambiental**, v. 17, p. 71-89, 2006.

Organisation for Economic Co-operation and Development - OECD. Guidelines for Testing of Chemical, Guideline 474, in: OECD (Ed.), **Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test**, Paris, 1997.

Organisation for Economic Co-operation and Development - OECD. Guidelines for Testing of Chemical, Guideline 425, in: OECD (Ed.), **Acute oral toxicity - Up-and-down-procedure** (UDP), Paris, 2008a.

Organisation for Economic Co-operation and Development - OECD. Guidelines for Testing of Chemical, Guideline 407, in: OECD (Ed.), **Repeated dose 28-day oral toxicity study in rodents**, Paris, 2008b.

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

Organisation for Economic Co-operation and Development - OECD. Test No. 489: **In Vivo Mammalian Alkaline Comet Assay**: OECD Publishing, 2014b.

Parky, D. C. **Great moments in pharmacy**. *Detroit*. Northwood Intitute Press, v. 238, 1966.

Parra, A. L., Yhebra, R. S., Sardiñas, G., Buela, I. Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD50 value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. **Phytomedicine**, v. 8, n. 5, p. 395-400, 2001.

Persson, C. Phylogeny of the neotropical *Alibertia* group (Rubiaceae), with emphasis on the genus *Alibertia*, inferred from ITS and 5S ribosomal DNA sequences. **American Journal of Botany**, v. 87, n. 7, p. 1018-1028, 2000.

Rebecca, M. A., Ishii-Iwamoto, E. L., Grespan, R., Cuman, R. K. N., Caparroz-Assefa, S. M., Mello, J. C. P., Bersani-Amado, C. A. Toxicological studies on *Stryphnodendron adstringens*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 83, p. 101-104, 2002.

Ribeiro, J. F.; Walter, B. M. T. **As principais fitofisionomias do bioma Cerrado**. Cerrado: ecologia e flora, v. 1, p. 153-212, 2008. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 83, p. 101-104, 2002.

Ribeiro, L. R.; Salvadori, D. M. F.; Marques, E. K. **Mutagênese Ambiental**. 1ª ed. Rio Grande do Sul: ULBRA Editora, 2003.

Rieder, A. Plants used for diabetes in the transition zone of Platinum and Amazon Hydrographic Basins, southwest portion of Mato Grosso, Brazil. **Planta Medica**, v. 79, n. 13, p. 8, 2013.

Rocha, M. S. **Compostos bioativos e atividade antioxidante in vitro de frutos do Cerrado piauiense**. 93 f. [Dissertação - Mestrado]. Universidade Federal do Piauí, 2011.

Roesler, R., Malta, L. G., Carrasco, L. C., Holanda, R. B., Souza, C. A. S., Pastore, G. M. Atividade antioxidante de frutas do cerrado. **Ciência e Tecnologia Alimentar**, v. 27, n. 1, p. 53-60, 2007.

Rojas, E., Lopez, M. C., Valverde, M. Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. **Journal of Chromatography**, v. 722, n. 1, p. 221-254, 1999.

Samanta, S., Dey, P. Micronucleus and its applications, *Diagn. Cytopathology*, v. 40, p. 84-90, 2012.

Samuelsson, G. **Drugs of Natural Origin: a Textbook of Pharmacognosy**, 5th Swedish Pharmaceutical Press, Stockholm, 2004.

Santana, A. I., Correa A., Mireya, D., Sanchez, V. Screening of Panamanian medicinal plants for brine shrimp toxicity, crown gall tumor inhibition, cytotoxicity and DNA intercalation. **Pharmaceutical Biology**, v. 34, n. 1, p. 19-27, 1996.

Santos, C. C., Vieira, M. C., Eidt, P. J., Heredia Zárata, N. A., Carnevali, T. O., Aran, H. D. V. R. Avaliação de Substratos na Emergência e Crescimento Inicial de Marmelo do Cerrado (*Alibertia edulis* Rich.) em Bandejas. **Cadernos de Agroecologia**, v. 9, n. 4, 2014.

Silva, V. C., Giannini, M. J. S. M., Carbone, V., Piacente, S., Pizza, C., Bolzani, V. da S., Lopes, M. N. New antifungal terpenoid glycosides from *Alibertia edulis* (Rubiaceae). **Helvetica Chimica Acta**, v. 91, n. 7, p. 1355-1362, 2008.

Soto-Sobenis, A., Castillo, B., Delgado, A., González, A., Montenegro, R. Alkaloid screening of herbarium samples of Rubiaceae from Panamá. **Pharmaceutical Biology**, v. 39, n. 3, p. 161-169, 2001.

Stone, R.. Lifting the veil on traditional Chinese medicine. **Science**, v. 319, p. 709-710, 2008.

Totter, J. R. Spontaneous cancer and its possible relationship to oxygen metabolism. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 77, p. 1763-1767, 1980.

Traesel, G. K., Souza, J. C., Barros, A. L., Souza, M. A., Schmitz, W. O., Muzzi, R. M., Oesterreich, S. A., Arena, A. C. Acute and subacute (28 days) oral toxicity assessment of the oil extracted from *Acrocomia aculeata* pulp in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 74, p. 320-325, 2014.

Traesel, G. K. **Avaliação do perfil toxicológico e genotóxico do óleo extraído da polpa da *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. Ex Mart.** [Dissertação - Mestrado]. Universidade Federal da Grande Dourados, 2014.

5. ARTIGOS COMPLETOS

5.1 Artigo publicado no periódico *Journal of Ethnopharmacology*

Este trabalho deu origem ao artigo “Acute and subacute toxicity of the aqueous extract of *Alibertia edulis* (Rich.) A. Rich. ex DC. in rats” o qual foi aceito para publicação no periódico *Journal of Ethnopharmacology*, qualis A1 na área de Biodiversidade, no dia 02 de novembro de 2016.

Avaliação da toxicidade aguda e subaguda do extrato aquoso das folhas de *Alibertia edulis* (Rich.) A.Rich. ex DC.

Resumo

Alibertia edulis, popularmente conhecida como "marmelo do Cerrado" é uma planta nativa do Cerrado brasileiro. Possui alto potencial alimentar e ornamental e o chá das folhas é popularmente utilizado por apresentar efeito hipoglicemiante, anti-hipertensivo e diurético. Para avaliar a segurança do extrato aquoso de folhas de *Alibertia edulis* (EAAE), foram realizados testes de toxicidade aguda e subaguda em ratos e ratas da linhagem Wistar. Os experimentos foram realizados de acordo com as diretrizes 425 e 407 da OCDE. Para a toxicidade aguda, uma dose única do EAAE (2000 mg/kg) foi administrada por gavagem a cinco ratas. Os animais foram observados durante 14 dias para quaisquer sinais de toxicidade e morte. Na toxicidade subaguda, foram administradas quatro doses (125, 250, 500 e 1000 mg/kg) de EAAE por 28 dias consecutivos. O grupo satélite recebeu a dose máxima (1000 mg/kg) por 28 dias e permaneceu não tratado durante mais 14 dias para observar efeitos de reversibilidade, persistência ou ocorrência de efeitos tóxicos tardios. Os cinco parâmetros do screening hipocrático, peso corporal, ingestão de alimentos e água foram observados diariamente. Ao final do experimento, foram coletadas amostras de sangue para análise hematológica e bioquímica. Os órgãos vitais e reprodutores foram inspecionados para quaisquer alterações histopatológicas. Não foram observadas mortes ou alterações comportamentais durante os dois experimentos, assim como não houveram alterações nos pesos dos órgãos, parâmetros bioquímicos, hematológicos e histopatológicos que pudessem indicar sinais de toxicidade. Todas as doses testadas podem ser consideradas seguras e a DL_{50} é superior a 2000 mg/kg. Portanto, outras avaliações são necessárias de modo a prosseguir para estudos clínicos.

Palavras-chave: marmelo do cerrado; plantas medicinais; toxicologia; metabólitos secundários; estudos pré-clínicos.

Abreviaturas

EAAE, extrato aquoso de *Alibertia edulis*; DL_{50} , dose letal média; ALT, alanina aminotransferase; AST, aspartato aminotransferase; RDW, largura de distribuição de

glóbulos vermelhos; HCM, hemoglobina corpuscular média; CHCM, concentração de hemoglobina corpuscular média; SNC, sistema nervoso central.

1. Introdução

As plantas têm sido utilizadas medicinalmente há milhares de anos e são uma importante fonte de drogas (Samuelsson, 2004). Algumas das práticas mais comuns envolvem o uso de extratos brutos de plantas, que podem conter uma ampla diversidade de moléculas com efeitos biológicos frequentemente desconhecidos (Konan et al., 2006). Por estas razões, as plantas medicinais tornaram-se foco de inúmeros estudos de modo a avaliar sua segurança, eficácia e validar os usos tradicionais (Stone, 2008).

O Brasil possui uma grande abundância de plantas nativas e o Cerrado representa cerca de 23% da superfície terrestre do país (Neto & Morais, 2003). A Rubiaceae é a quarta maior família de angiospermas distribuídas entre o Cerrado e é considerada a sétima família mais rica em espécies, com pelo menos 118 gêneros e 1.347 espécies (Mendonça et al 2008, Barbosa et al., 2013). O gênero *Alibertia* possui um grande número de espécies com alta importância econômica e farmacêutica, uma vez que algumas espécies deste gênero possuem atividades antitumorais, citotóxicas e antioxidantes (Rocha, 2011; Mendonça et al., 2013).

Alibertia edulis, popularmente conhecido como "marmelo do Cerrado" é uma planta amplamente distribuída no Brasil. Tem potencial ornamental e seus frutos são uma fonte de alimento para a população local (Almeida et al., 1998, Marin, 2006). Os efeitos farmacológicos de *A. edulis* foram estudados devido à presença de compostos triterpênicos nas folhas (Cronquist, 1981, Brochini et al., 1994). Seu potencial hipoglicêmico, anti-hipertensivo, diurético e antitumoral está sendo estudado atualmente, já que as folhas de chá são usadas popularmente para esses fins (Rieder, 2013; Marques et al., 2013).

Uma triagem fitoquímica de folhas de *A. edulis* revelou a presença de flavonóides, alcalóides, saponinas, taninos, antraquinonas, terpenoides, carotenóides, clorofila a e b. Estudos fitoquímicos realizados com as hastes de *A. edulis* mostraram a presença de iridoides, saponinas, bem como a presença de um oleanano (Brochini et al., 1994), alcalóides e taninos (Soto-Sobenis et al., 2001; Silva et al. Coe et al., 2010).

As plantas medicinais, assim como outras drogas convencionais, podem causar efeitos nocivos ao organismo. Assim, estudos toxicológicos são de extrema importância

para avaliar a segurança e possíveis efeitos colaterais que podem surgir quando utilizadas em excesso, especialmente quando consumidos para fins terapêuticos. Portanto, o objetivo do estudo foi avaliar o perfil toxicológico do extrato aquoso das folhas de *A. edulis* em ratos.

2. Materiais e Métodos

2.1 Coleta e identificação botânica

Folhas de *Alibertia edulis* (Rich.) A.Rich. Ex DC. foram coletados em uma área de Cerrado de Dourados, Mato Grosso do Sul (latitude 22°08'05 " Sul e longitude 55°08'17" Oeste), de acordo com a licença de acesso e transporte de amostras de recursos genéticos nº 010220 / 2015- 1 - CNPq / CGEN / MMA. Uma exsicata foi autenticada pela Dr^a. Zefa Valdevina Pereira sob o número 4649 e depositado no herbário da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD).

2.2 Preparo do extrato

O extrato aquoso de folhas de *A. edulis* (EAAE) foi preparado de uma forma que, na medida do possível, imitasse o método que os praticantes de ervas tradicionais usam para extrair seus remédios vegetais. As folhas secas (58,1% de umidade) e pulverizadas (granulometria ≤ 1 mm) foram suspensas em água destilada (1:10 m / v) e a mistura fervida (97°C) por 15 min. A decocção obtida foi filtrada, congelada a -70 ° C, liofilizada (rendimento: 36,9% p / p) e armazenada num congelador a -18 ° C (Coe et al., 2010).

2.3 Screening fitoquímico

Uma triagem fitoquímica do EAAE foi realizada de modo a avaliar a presença ou ausência de alguns grupos de compostos bioativos tais como: flavonóides, alcalóides, saponinas, taninos, antraquinonas, terpenóides, fenóis, carotenóides, clorofila a e b. A triagem foi realizado de acordo com os protocolos descritos por Silva et al. (2010) para flavonóides, alcalóides, saponinas e taninos; Ayoola et al. (2008) para antraquinonas e terpenóides e Costache & Campeanu (2012) para carotenóides, clorofila a e b.

2.4 Animals

Ratos Wistar (8-12 semanas, 180-250 g fêmeas, 350-450 g machos) provenientes da Universidade Estadual de Maringá, foram mantidos em condições padrão (23°C e 12h

ciclo claro e escuro) e tinham acesso *ad libitum* a ração comercial e água. Para o teste de toxicidade aguda, 10 ratas foram utilizadas e 60 ratos (30 fêmeas e 30 machos) para o teste de toxicidade subaguda (OECD, 2008a, 2008b). Todos os procedimentos envolvendo animais foram realizados de acordo com os Princípios Éticos em Pesquisa Animal e aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Grande Dourados (protocolo: 29/2015).

2.5 Estudos de toxicidade

Os estudos de toxicidade aguda e subaguda foram baseados na OCDE (Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico) - guias 425 e 407 (OCDE, 2008a, 2008b).

2.5.1 Toxicidade aguda

Dez ratos Wistar foram divididos igualmente em dois grupos (controle e grupo teste). A dose limite (2000 mg/kg) do EAAE foi dissolvida em solução salina e administrado por gavagem a uma fêmea do grupo de teste (OCDE, 2008a). Sequencialmente, em intervalos de 48 horas, administrou-se a mesma dose a quatro fêmeas, totalizando cinco animais tratados (grupo de teste: EAAE 2000 mg/kg). Paralelamente, todos os animais do grupo controle receberam solução salina (1 ml/kg) de modo a estabelecer um grupo controle negativo comparativo (OCDE, 2008a). Após a administração, os animais foram observados constantemente nas primeiras 24h e posteriormente, uma vez por dia durante 14 dias consecutivos, para quaisquer sinais de toxicidade e letalidade.

Os cinco parâmetros da triagem hipocrática (Malone & Robichaud, 1962) foram analisados diariamente: estado de consciência; atividade e coordenação do sistema motor e tonificação muscular; reflexos; atividade do sistema nervoso central e atividades no sistema nervoso autônomo. Todos os animais foram submetidos a eutanásia por anestesia com isoflurano (inalação) seguida de exsanguinização. Os órgãos (coração, pulmão, baço, fígado, rim, útero e ovário direito) foram removidos, pesados e examinados de modo a avaliar alterações macroscópicas (Traesel et al., 2014).

2.5.2 Toxicidade subaguda

Ratos e ratas Wistar foram alojados em seis grupos experimentais de 10 animais, cada um contendo 5 machos e 5 fêmeas, separadamente. Quatro doses do EAAE (125,

250, 500, 1000 mg/kg) foram administradas por gavagem, diariamente, durante 28 dias consecutivos. Um quinto grupo formado por 10 animais (5 machos e 5 fêmeas) foi estabelecido como grupo controle negativo e recebeu, diariamente, solução salina (1 ml/kg) por gavagem. Outro grupo (Satélite) recebeu a dose máxima (1000 mg/kg) do EAAE durante 28 dias e permaneceu sem ser tratado por mais 14 dias de modo a observar efeitos de reversibilidade, persistência ou ocorrência de efeitos tóxicos tardios.

As doses foram escolhidas com base no guia 407 da OCDE (Estudo de Toxicidade Oral com Dose Repetida de 28 Dias em Roedores) e de acordo com a DL_{50} obtida a partir do teste de toxicidade aguda (OCDE, 2008b). Foram observados e registrados diariamente os cinco parâmetros da traígem hipocrática, peso corporal, consumo de água e ração. No final do período de observação (28º dia), os animais foram deixados em jejum durante a noite com acesso livre à água e no 29º dia, os animais tratados com quatro doses diferentes de AEAE foram submetidos a eutanásia por anestesia com isoflurano (inalação) seguido de exsanguinação.

As amostras de sangue foram coletadas via punção cardíaca para análise hematológica e bioquímica. Além disso, os órgãos vitais (coração, pulmão, rim, fígado e baço) e órgãos reprodutivos (testículo, epidídimo, útero e ovário) foram isolados, pesados, dissecados e depois inspecionados para quaisquer alterações histopatológicas. Foi também realizada uma avaliação histológica do cérebro de um animal de todos os grupos, a fim de investigar a presença de lesões histológicas devido à toxicidade do sistema nervoso central. Os mesmos procedimentos foram cuidadosamente realizados 14 dias depois para os grupos controle e satélite.

2.5.2.1 Análises hemato-bioquímicas

Os seguintes parâmetros bioquímicos foram analisados: bilirrubina total, glicose, colesterol, triglicerídeos, eletrólitos (sódio, potássio e cálcio), marcadores da função renal (uréia, ácido úrico e creatinina) e fígado (alanina aminotransferase, aspartato aminotransferase, fosfatase alcalina e gamma-glutamil transpeptidase) e perfil proteico (albumina e proteína total) utilizando Cobas C111 Plus sing comercial kits (Roche) (Lincopan et al., 2005). A análise hematológica determinou a contagem total e diferencial de leucócitos, eritrócitos e plaquetas, além dos níveis de hemoglobina, hematócrito e distribuição de glóbulos vermelhos, com a unidade KX-21 (Sysmex).

2.5.2.2 Análises histopatológicas

Os órgãos foram removidos, pesados e fixados em formalina tamponada neutra a 10%. Após a fixação, os fragmentos de órgão foram clivados, desidratados em concentrações absolutas de etanol, diafanizados em xileno e incorporados em parafina. As secções foram cortadas com uma espessura de 5 µm e coradas com hematoxilina e eosina (H & E) para avaliação através de microscopia óptica (Lilli, 1965; Martey et al., 2010).

2.6 Análise estatística

As comparações estatísticas entre os dados para os grupos controle e tratado foram realizadas utilizando o teste t de Student (toxicidade aguda). As diferenças entre os grupos de toxicidade subaguda foram determinadas por análise de variância (ANOVA unidireccional) seguida pelo teste de Dunnett. Valores de P inferiores a 0,05 foram definidos como o nível de significância.

3. Resultados e Discussão

As plantas medicinais têm sido utilizadas por até 80% da população nos países em desenvolvimento devido à crença de que tudo o que é natural está livre de efeitos tóxicos (Hilaly et al., 2004). No entanto, como as plantas venenosas são omnipresentes (Kingsbury, 1964), as investigações químicas e toxicológicas são de suma importância para garantir a eficácia e a segurança dos medicamentos tradicionais.

Um rastreio fitoquímico do EAAE (Tabela 1) revelou a presença de flavonóides, alcalóides, saponinas, taninos, fenóis, carotenóides, clorofila a e b. Os flavonóides têm efeitos antitrombóticos, anti-hipertensivos, anti-isquêmicos, aumentam a lipólise, retardam o processo degenerativo e têm o potencial de modificar a biossíntese dos eicosanóides (Silva et al., 2015). As saponinas apresentam propriedades antivirais, antioxidantes, hipocolesterolêmicas e antidiabéticas (Ali et al., 2008) (Akhtar & Mirza, 2015). Terpenos e taninos provaram ser eficazes no tratamento da hipertensão, queimaduras e apresentaram atividade bactericida e fungicida (Silva et al., 2010). Os carotenóides estimulam o sistema imunológico, reduzem o risco de doenças crônicas (Rodriguez-Amaya, 2010) e têm atividade anti-edema (Lima et al., 2014).

Uma investigação fitoquímica das hastes de *A. edulis* levou ao isolamento e identificação de um novo éster iridóide e uma nova saponina, que mostraram atividades

inibitórias moderadas contra *Candida albicans* e *C. krusei* em um ensaio de diluição (Silva et al., 2008). Também foi possível identificar a presença de um oleanano (Brochini et al., 1994), alcalóides e taninos, que podem estar envolvidos com as atividades biológicas evidenciadas, bem como atividades tóxicas com os alcalóides (Soto-Sobenis et al., 2001, Coe et al., 2010, Silva et al., 2010).

Outras espécies do gênero *Alibertia* possuem muitas atividades biológicas, como atividade antitumoral, citotóxica (Gupta et al., 1996) e propriedades antioxidantes devido à presença de compostos fenólicos em extratos aquosos e etanólicos de frutos de *A. sessilis* (Rocha, 2011). Cinco flavonóides isolados das partes aéreas de *A. myrciifolia* apresentaram atividade citotóxica e foram capazes de inibir o crescimento de células tumorais (Gadelha Militao et al., 2005). Estudos realizados com *A. sessilis* e *A. macrophylla* levaram ao isolamento de ésteres de ácido cafeico e de iridoides não glicosilados, que são metabolitos secundários com atividade antifúngica (Bolzani et al., 1991).

Algumas espécies vegetais foram avaliadas em relação à sua toxicidade. Os extratos obtidos de *Acrocomia aculeata* e *Polypodium leucotomos* apresentaram baixa toxicidade após exposição aguda e/ou subaguda (Traesel et al., 2014; Murbach et al., 2015). No entanto, outros apresentaram alguma toxicidade, como os extratos de *Stryphnodendron polyphyllum* e *Ruta chalepensis* (Vital et al., 1987; Gonzales et al., 2006), o que reforça a importância das avaliações toxicológicas.

Após o teste de toxicidade aguda, não foram observados mortes ou quaisquer sintomas tóxicos, assim como nenhuma alteração no consumo de água e alimentos em nenhum dos animais tratados com uma dose única de EAAE (2000 mg/kg). As fêmeas apresentaram ganho de peso corporal e não houve diferença estatística nos pesos relativos dos órgãos ou no peso dos órgãos-alvo quando comparados ao grupo controle (Tabela 2). A necropsia no final do período experimental (15º dia) não revelou alterações significativas em nenhum órgão. Visto que a dose letal média (DL₅₀) do EAAE para ratas Wistar é superior a 2000 mg/kg, a substância testada é considerada de baixa toxicidade e classificada na classe 5 (OCDE, 2008a).

Nenhuma morte foi registrada ao término dos experimentos de toxicidade subaguda. Os animais permaneceram ativos e não apresentaram alterações de comportamento quando estimulados pela triagem hipocrática durante o período de observação de 28 dias. Além disso, não foi observada ocorrência de efeitos tóxicos tardios ou efeitos de reversibilidade durante os 14 dias de observação do grupo satélite. Não

houve diferença estatística em relação ao ganho de peso corporal, bem como no consumo de água. No entanto, o consumo alimentar dos ratos machos no grupo satélite diminuiu quando comparado com o grupo controle. Embora a ingestão média diferiu estatisticamente, nenhuma importância biológica foi atribuída a esta alteração, uma vez que os valores de ganho de peso corporal não diferiram entre os grupos (Tabela 2).

O peso dos órgãos é uma importante indicação do estado patológico e fisiológico dos animais (Raina et al., 2015). O EAAE não induziu qualquer efeito nocivo sobre o peso relativo dos órgãos de ratos e ratas tratadas (Tabela 3). Por outro lado, houve uma diferença significativa no peso dos rins das ratas tratadas com doses de 125 mg/kg e 500 mg/kg do EAAE quando comparado com o grupo controle. Entretanto, nenhuma alteração histológica que evidencie a presença de patologia ou alteração nos parâmetros bioquímicos relacionados à função renal que justifique a perda de peso corporal foi encontrada, o que é uma variabilidade esperada. Além disso, a alteração do peso dos rins não ocorreu nos grupos que receberam a dose mais elevada, o que confirma que esta alteração não é dose dependente.

Houve também uma diferença significativa no peso relativo dos ovários das ratas tratadas com 125 mg/kg e 1000 mg/kg do EAAE quando comparados com o grupo de controle. No entanto, visto que o controle do ciclo estral não foi realizado, essa variação de peso dos órgãos reprodutores é esperada (Vilela et al., 2007).

A avaliação dos parâmetros hematológicos (Tabela 4) é importante para avaliar o estado fisiológico e patológico em humanos e animais (Khan et al., 2011). Os parâmetros bioquímicos (Tabela 5) são essenciais, pois fornecem informações sobre os principais efeitos tóxicos nos tecidos, especificamente os efeitos nos rins e no fígado. Algumas enzimas e proteínas podem ser usadas para indicar efeitos hepatocelulares (observados em ALT, AST, gamma glutamil transferase e bilirrubina). Os níveis de colesterol são um indicador indireto da função hepática, creatinina, ácido úrico e uréia no sangue como biomarcadores da lesão funcional nos néfrons (Brandt et al., 2009).

Em relação à análise hematológica (Tabela 4), alguns parâmetros (leucócitos, eritrócitos, hematócrito, CHM, CHCM, neutrófilos, linfócitos e monócitos) apresentaram diferença estatística nos grupos tratados com o EAAE e outros parâmetros hematológicos (hemoglobina, plaquetas, largura de distribuição de glóbulos vermelhos, neutrófilos segmentados, eosinófilos e basófilos) foram semelhantes entre os grupos quando comparados ao grupo controle. As diferenças observadas não são biologicamente significativas, uma vez que os valores estão dentro dos valores normais de referência para

a espécie (Dantas et al., 2006; Lapchik et al., 2009; Lima et al., 2014), indicando que o EAAE não causou efeitos adversos sobre as células sanguíneas circulantes ou sobre a sua produção.

Neste estudo, alguns parâmetros hepáticos e renais (ALT, AST, bilirrubina, gamma glutamil transferase e uréia no sangue) e todos os demais parâmetros bioquímicos (fosfatase alcalina, albumina, sódio, potássio, cálcio, colesterol, triglicérides, ácido úrico e glicose) foram estatisticamente diferentes quando comparados com o grupo controle (Tabela 5). No entanto, essas diferenças não têm significância clínica, uma vez que os valores encontrados estão dentro dos valores normais de referência para a espécie (Dantas et al., 2006; Lapchik et al., 2009; Lima et al., 2014).

Por outro lado, os ratos tratados com doses de 125 mg/kg, 250 mg/kg e 500 mg/kg do EAAE mostraram uma diminuição nos níveis de creatinina e um aumento nos níveis de proteína total quando comparados com o grupo controle. Não obstante, a água, a ingestão de alimentos e o peso corporal dos animais não diferiram entre os grupos e em comparação com o controle. Além disso, não foram encontradas alterações histológicas nos rins e fígados destes animais, o que sugere que esta variabilidade é normal entre os animais e não está associada a um efeito tóxico. Além disso, o aumento da proteína total reforça a hipótese de baixa toxicidade do extrato.

A avaliação histológica dos órgãos selecionados (cérebro, coração, pulmão, rim, fígado, baço, testículos, epidídimo, útero e ovário) dos animais tratados confirmou ainda a baixa toxicidade do EAAE, uma vez que não apresentou achados sugestivos de efeitos tóxicos (Figura 1). Além disso, não foi registrada qualquer letalidade para qualquer dose durante os 28 dias de tratamento.

4. Conclusões

Todas as doses do EAAE podem ser consideradas seguras visto que não causaram letalidade, danos nos órgãos ou alterações adversas no comportamento geral nos estudos de toxicidade aguda e subaguda em ratos. Estes resultados fornecem dados preliminares valiosos sobre o perfil toxicológico de *A. edulis*, no entanto, o uso a longo prazo pode resultar em toxicidade grave. Por conseguinte, são necessárias outras avaliações (tais como estudos de genotoxicidade, toxicidade crônica, toxicidade reprodutiva e outras) para prosseguir com estudos clínicos desta planta.

Apoio financeiro

Este trabalho foi financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (FUNDECT) e pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Referências

- Akhtar, N., Mirza, B., 2015. Análise fitoquímica e avaliação abrangente das propriedades antimicrobianas e antioxidantes de 61 espécies de plantas medicinais. *Jornal Arabian de Química* .
- Ali, S. S., Kasoju, N., Luthra, A., Singh, A., Sharanabasava, H., Sahu, A.; Bora, U., 2008. Indian medicinal herbs as sources of antioxidants. *Food Research International*, 41(1), 1-15.
- Almeida, S. P., Proença, C. E. B., Sano, S. M., Ribeiro, J. F., 1998. Cerrado: espécies vegetais úteis. EMBRAPA, Brasília.
- Ayoola, G. A., Coker, H. A. B., Adesegun, S. A., Adepoju-Bello, A. A., Obaweya, K., Ezennia, E. C., Atangbayila, T. O., 2008. Phytochemical Screening and Antioxidant Activities of Some Selected Medicinal Plants Used for Malaria Therapy in Southwestern Nigeria. *Trop. J. Pharm. Res.* (3), 1019-1024.
- Barbosa, M. R., Zappi, D., Taylor, C., Cabral, E., Jardim, J. G., Pereira, M. S., Calió, M. F., Pessoa, M. C. R., Salas, R., Souza, E. B., Di Maio, F. R., Macias, L., Anunciação, E. A., Germano Filho, P., Oliveira, J. A., Bruniera, C. P., M. Gomes & Toni, K., 2013. Rubiaceae. In *Lista de Espécies da Flora do Brasil*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro/ [http://fl_oradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/fl_oradobrasil/FB210/](http://fl.oradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/fl_oradobrasil/FB210/) (accessed 10.10.16).
- Brandt, A. P., Oliveira, L. F. S., Fernandes, F. B., Alba, J., 2009. Evaluation of prospective hypocholesterolemic effect and preliminary toxicology of crude extract and decoction from *Vitex megapotamica* (Spreng) Moldenke (*V. montevidensis* Cham.) *in vivo*. *Rev. Bras. de Farmacogn.* 19, 388–393.
- Bolzani, V. DA S., Trevisan, L. M. V., Young, M. C. M., 1991. Caffeic acid esters and triterpenes of *Alibertia macrophylla*. *Phytochemistry*, 30 (6), 2089-2091.
- Brochini, C. B., Martins, D., Roque, N. F., 1994. An oleanane acid from *Alibertia edulis*. *Phytochemistry*, 36, 1291-1295.
- Coe, F. G., Parikh, D. M., Johnson, C.A., 2010. Alkaloid presence and brine shrimp (*Artemia salina*) bioassay of medicinal species of eastern Nicaragua. *Pharm. biol.* 48 (4), 439-445.

Costache, M. A., Campeanu, G., Neata, G., 2012. Studies concerning the extraction of chlorophyll and total carotenoids from vegetables. Rom. Biotechnol. Lett., 5, 7702-8.

Cronquist, A., 1981. An integrated system of flowering plants. New York: Columbia University Press, 1262 p. il.

Dantas, J. A., Ambiel, C. R., Cuman, R. K. N., Baroni, S.; Bersani-Amado, C. A., 2006. Valores de referência de alguns parâmetros fisiológicos de ratos do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá, Estado do Paraná. Acta Sci. Health Sci. 28 (2), 165-170.

Gadelha Militao, G. C., ÓPessoa, C., Costa-Lotufo, L.V., Moraes, M. E. A., Moraes, M. O., Luciano, J. H. S., Lima, M. A. S., Silveira, E. R., 2005. Cytotoxicity of Flavonoids Isolated from *Alibertia myrciifolia*. Pharm. biol. 43 (5), 480-484.

Gonzales, J., Benavides, V., Rojas, R., Pino, J., 2006. Efecto embriotóxico y teratogénico de *Ruta chalepensis* L. «ruda», en ratón (*Mus musculus*). Rev. Peru. Biol. 13 (3), 223-5.

Gupta, M. P., Monge, A., Karikas, G. A., Cerain, A. L., Solis, P.N., Leon, E., Trujillo, M., Suarez, O., Wilson, F., Montenegro, G., Noriega, Y., Santana, A. I., Correa, M., Sanchez, C., 1996. Screening of Panamanian medicinal plants for brine shrimp toxicity, crown gall tumor inhibition, cytotoxicity and DNA intercalation. Pharm. Biol. 34 (1), 19-27.

Hilaly, J. E., Israili, Z. H., Lyoussi, B., 2004. Acute and chronic toxicological studies of *Ajuga iva* in experimental animals. J. Ethnopharmacol. 91, 43–50.

Khan, S. A., Epstein, J. H., Olival, K. J., Hassan, M. M., Hossain, M. B., Rahman, K. B. M. A., Elahi, M. F., Mamun, M. A., Haider, N., Yasin, G., Desmond, J., 2011. Hematology and serum chemistry reference values of stray dogs in Bangladesh. Open Vet. J. 1, 13-20.

Kingsbury, J. M., 1964. Poisonous Plants of the United States and Canada. Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, NJ, USA.

Konan, N. A., Bacchi, E. M., Lincopan, N., Varela, S. D., Varanda, E. A., 2006. Acute, subacute toxicity and genotoxic effect of a hydroethanolic extract of the cashew (*Anacardium occidentale* L.). J. Ethnopharmacol. 110, 30–38.

Lapchik, V. B. V., Mattaraia, V. G. M., Ko, G. M., 2009. Cuidados e Manejo de Animais de Laboratório. Editora Atheneu Rio. 1ª edição.

Lilli R. D., 1965. Histopathologic Technique and Practical Biochemistry. London: McGraw Hill Book Company.

Lima, C. M., Lima, A. K., Melo, M. G. D., Dória, G. A. A., Leite, B. L. S., Serafini, M. R., Albuquerque-Júnior, R. L. C., Araújo, A. A. S., 2014. Valores de referência hematológicos e bioquímicos de ratos (*Rattus norvegicus* linhagem *Wistar*) provenientes do biotério da Universidade Tiradentes. Scientia Plena 10, 034601.

- Lima, F. F.; Kassuya, C. A. L.; Sanjinez-Argandoña, E. J., 2014. Microencapsulação do óleo de bacuri por coacervação complexa: obtenção, caracterização e avaliação biológica. 64f. Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental – Faculdade de Ciências Exatas e Tecnologias, Universidade Federal da Grande Dourados – Dourados.
- Lincopan, N., Mamizuka, E. M., Carmona-Ribeiro, A., 2005. Low nephrotoxicity of an effective amphotericin B formulation with cationic bilayer fragments. *J. Antimicrob. Chemother.* 55, 727–734.
- Malone, M. H., Robichaud, R. C., 1962. A hippocratic screen for pure or crude drug materiais. *J. Nat. Prod. - Lloydia*, 25 (4), 320-331.
- Marin, A. M. F., 2006. Pontencial nutritivo de frutos do cerrado: composição em minerais e componentes não convencional. 121 f. [Tese - Doutorado]. Universidade de Brasília.
- Marques, M. C. S., Hamerski, L., Garcez, F. R., Tieppo, C., Vasconcelos, M., Torres-Santos, E. C., Garcez, W. S., 2013. In vitro biological screening and evaluation of free radical scavenging activities of medicinal plants from the Brazilian Cerrado. *J. Med. Plant. Res.* 7 (15), 957-962.
- Martey, O. N. K., Armah, G., Okine, L. K. N., 2010. Absence of organ specific toxicity in rats treated with Tonica, an aqueous herbal haematinic preparation. *Afr. J. Tradit. Complement. Altern. Med.* 7 (3), 231-240.
- Mendonça, A. C. A. M., Silva, M. A. P., Seixas, E. N. C., Dos Santos, M. A. F., 2013. Rubiaceae: aspectos ecológicos e reprodutivos. *Cadernos de Cultura e Ciência*, 12 (2), 8-20.
- Mendonça, R. C., Felfili, J. M., Walter, B. M. T., Silva-Júnior, M. C., Rezende, A. V., Filgueiras, T. S., Nogueira, P. E. & Fagg, C. W., 2008. Flora vascular do bioma Cerrado: checklist com 12.356 espécies. Pp. 421-1279. In: Sano, S.M.; Almeida, S.P. & Ribeiro, J.F. (orgs.). *Cerrado: ecologia e flora*. Brasília, DF, EMBRAPA.
- Murbach, T. S., Béres, E., Vértesi, A., Glávits, R., Hirkab, G., Endres, J. R., Clewell, A. E., Szakonyiné, I. P., 2015. A comprehensive toxicological safety assessment of an aqueous extract of *Polypodium leucotomos* (Fernblock®). *Food Chem. Toxicol.* 86, 328–34.
- Neto, G. G., Morais, R. G., 2003. Recursos medicinais de espécies do Cerrado de Mato Grosso: um estudo bibliográfico. *Rev. Acta Bot. Bras.* 17(4), 561-584.
- OECD, 2008a. Guidelines for testing of chemical. Acute oral toxicity–up-and-down procedure. OECD (Ed.): Paris.
- OECD, 2008b. Guidelines for testing of chemical. Repeated dose 28-day oral toxicity study in rodents. OECD (Ed.): Paris.
- Raina, P., Chandrasekaran, C.V., Deepak, M., Aggarwal, A., Ruchika, K. G., 2015. Evaluation of subacute toxicity of methanolic/aqueous preparation of aerial parts of O.

sanctum in Wistar rats: Clinical, hematological, biochemical and histopathological studies. *J. Ethnopharmacol.* 175, 509-17.

Rieder, A., 2013. Plants used for diabetes in the transition zone of Platinum and Amazon Hydrographic Basins, southwest portion of Mato Grosso, Brazil. *Planta Med.* 79 (13), 8.

Rocha, M. S., 2011. Compostos bioativos e atividade antioxidante in vitro de frutos do Cerrado piauiense. 93 f. [Dissertação - Mestrado]. Universidade Federal do Piauí.

Rodriguez-Amaya, D.B., 2010. Quantitative analysis, in vitro assessment of bioavailability and antioxidant activity of food carotenoids-A review. *J Food Comp. Anal.*, 23, 726-740.

Samuelsson, G., 2004. *Drugs of Natural Origin: a Textbook of Pharmacognosy*, 5th Swedish Pharmaceutical Press, Stockholm.

Silva, L. R., Martins, L. D. V., Calou, I. B. F., Deus, M. S. M., Ferreira, P. M. P., Peron, A. P., 2015. Flavonóides: química Constituição, Ações Medicinais e potencial tóxico. *Acta Toxicol. Argent.*, 23 (1), 36-43.

Silva, N. L. A., Miranda, F. A. A., Conceição, G. M., 2010. Triagem fitoquímica de plantas de Cerrado, da área de proteção ambiental municipal do Inhamum, Caxias, Maranhão. *Scientia Plena*, v. 6, n. 2.

Silva, V. C., Giannini, M. J. S. M., Carbone, V., Piacente, S., Pizza, C., Bolzani, V. da S., Lopes, M. N., 2008. New antifungal terpenoid glycosides from *Alibertia edulis* (Rubiaceae). *Helv. Chim. Acta*, 91 (7), 1355-1362.

Soto-Sobenis, A., Castillo, B., Delgado, A., González, A., Montenegro, R., 2001. Alkaloid screening of herbarium samples of Rubiaceae from Panamá. *Pharm. Biol.* 39(3), 161-169.

Stone, R., 2008. Lifting the veil on traditional Chinese medicine. *Science* 319, 709–710.

Traesel, G. K., Souza, J. C., Barros, A. L., Souza, M. A., Schmitz, W. O., Muzzi, R. M., Oesterreich, S. A., Arena, A. C., 2014. Acute and subacute (28 days) oral toxicity assessment of the oil extracted from *Acrocomia aculeata* pulp in rats. *Food Chem. Toxicol.* 74, 320–325.

Vilela, M. G., Júnior, J. L. S., Silva, J. G. C. S., 2007. Determination of estrous cycle in rats by vaginal lavage. *Femina*, 35 (10), 667-670.

Vitral, G. S. F., Peters, V. M., Guerra, M. O., 1987. Mecanismos da ação embriótóxica do barbatimão (*Stryphnodendron polyphyllum* M.). *Reprod. Climat.* 3, 222-6.

Young, M. C. M., Braga, M. R., Dietrich, S. M. C., Gottlieb, H. E., Trevisan, L. M. V., Bolzani, V. DA S., 1992. Fungitoxic non-glycosidic iridoids from *Alibertia macrophylla*. *Phytochemistry*, 31 (10), 3433-3435.

Tabela 1. Compostos identificados no extrato aquoso de *Alibertia edulis* (EAAE).

Compostos	EAAE
Flavonoides	+
Alcaloides	+
Saponinas	+
Taninos	+
Antraquinonas	-
Terpenoides	-
Carotenoides	+
Clorofila a	+
Clorofila b	+

O sinal (+) indica a presença e (-) a ausência do constituinte químico.

Tabela 2 – Ganho de peso corporal, consumo de água e ração dos animais tratados oralmente com o extrato aquoso de *Alibertia edulis* (EAAE).

	Toxicidade aguda		Toxicidade subaguda					
	Controle	2000 mg/kg	Controle	125 mg/kg	250 mg/kg	500 mg/kg	1000 mg/kg	Satélite
Fêmeas								
Peso inicial (g)	237.00 ± 9.14	235.00 ± 16.80	239.80 ± 20.86	249.40 ± 25.36	246.50 ± 20.37	246.40 ± 13.27	236.20 ± 20.77	225.20 ± 36.85
Peso final (g)	254.00 ± 12.90	250.00 ± 12.90	273.60 ± 24.40	268.60 ± 31.46	272.00 ± 12.19	266.20 ± 16.11	258.00 ± 11.06	280.60 ± 33.63
Ganho de peso corporal (%)	6.88 ± 2.24	6.96 ± 2.22	9.55 ± 2.43	7.69 ± 5.55	10.63 ± 5.03	8.00 ± 0.91	9.61 ± 5.98	17.98 ± 8.93
Ingestão de ração (g/day)	100.20 ± 3.06	100.10 ± 3.35	108.66 ± 10.33	109.00 ± 4.5	92.00 ± 2.00	109.5 ± 9.5	99.00 ± 7.5	106.55 ± 7.16
Ingestão de água (ml/day)	186.70 ± 5.91	184.80 ± 5.71	195.83 ± 5.55	188.75 ± 16.25	190.00 ± 15.00	186.25 ± 18.75	182.5 ± 8.75	187.5 ± 16.66
Machos								
Peso inicial (g)			428.00 ± 42.17	433.75 ± 41.15	430.4 ± 41.43	445.60 ± 29.59	439.20 ± 27.12	425.75 ± 14.93
Peso final (g)			458.40 ± 45.63	446.00 ± 69.64	444.00 ± 56.48	466.60 ± 32.76	465.60 ± 25.16	470.50 ± 7.32
Ganho de peso corporal (%)			5.39 ± 2.75	2.62 ± 10.18	3.21 ± 8.87	4.75 ± 4.05	6.05 ± 1.61	8.59 ± 4.04
Ingestão de ração (g/day)			130.33 ± 16.55	111.25 ± 9.25	121.25 ± 12.25	119.00 ± 8.5	122.00 ± 8.5	106.33 ± 2.33*
Ingestão de água (ml/day)			203.33 ± 17.77	195.00 ± 7.5	202.5 ± 8.75	223.75 ± 23.75	203.75 ± 18.12	208.33 ± 16.11

Valores expressos pelas médias ± DP, n = 5 animais/grupo.

* p < 0.05 comparado com o grupo controle (ANOVA/Dunnett).

Tabela 3 – Peso relativo dos órgãos (g/100g de peso corporal) dos animais tratados oralmente com o extrato aquoso de *Alibertia edulis* (EAAE).

	Toxicidade aguda		Toxicidade subaguda					
	Controle	2000 mg/kg	Controle	125 mg/kg	250 mg/kg	500 mg/kg	1000 mg/kg	Satélite
Fêmeas								
Fígado	3.75 ± 0.06	4.09 ± 0.19	3.30 ± 0.27	3.25 ± 0.17	3.20 ± 0.07	3.30 ± 0.16	3.25 ± 0.07	3.28 ± 0.17
Rim	0.39 ± 0.00	0.39 ± 0.01	0.39 ± 0.03	0.34 ± 0.02*	0.35 ± 0.01	0.33 ± 0.01*	0.35 ± 0.01	0.36 ± 0.03
Baço	0.21 ± 0.01	0.23 ± 0.02	0.22 ± 0.03	0.20 ± 0.02	0.19 ± 0.02	0.19 ± 0.01	0.19 ± 0.01	0.21 ± 0.04
Coração	0.44 ± 0.00	0.46 ± 0.05	0.46 ± 0.07	0.42 ± 0.02	0.46 ± 0.03	0.45 ± 0.04	0.46 ± 0.05	0.42 ± 0.04
Pulmão	0.68 ± 0.01	0.71 ± 0.09	0.63 ± 0.06	0.62 ± 0.06	0.70 ± 0.06	0.64 ± 0.05	0.66 ± 0.07	0.64 ± 0.09
Ovário	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.06 ± 0.01	0.02 ± 0.00*	0.02 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.02 ± 0.01*	0.05 ± 0.04
Útero	0.20 ± 0.02	0.22 ± 0.01	0.28 ± 0.12	0.19 ± 0.01	0.25 ± 0.07	0.23 ± 0.08	0.26 ± 0.08	0.30 ± 0.09
Machos								
Fígado			3.17 ± 0.20	3.38 ± 0.12	2.96 ± 0.26	3.14 ± 0.21	3.13 ± 0.18	3.05 ± 0.25
Rim			0.34 ± 0.03	0.35 ± 0.03	0.31 ± 0.02	0.33 ± 0.02	0.33 ± 0.02	0.33 ± 0.03
Baço			0.14 ± 0.01	0.15 ± 0.02	0.15 ± 0.01	0.13 ± 0.01	0.13 ± 0.01	0.14 ± 0.02
Coração			0.41 ± 0.01	0.41 ± 0.01	0.43 ± 0.04	0.43 ± 0.02	0.42 ± 0.03	0.41 ± 0.02
Pulmão			0.51 ± 0.03	0.58 ± 0.08	0.69 ± 0.24	0.54 ± 0.07	0.54 ± 0.46	0.53 ± 0.04
Testículo			0.38 ± 0.03	0.37 ± 0.05	0.35 ± 0.02	0.34 ± 0.03	0.37 ± 0.05	0.30 ± 0.12
Epidídimo			0.13 ± 0.02	0.13 ± 0.01	0.13 ± 0.01	0.12 ± 0.01	0.14 ± 0.02	0.12 ± 0.02

Valores expressos pelas médias ± DP, n = 5 animais/grupo.

* p < 0.05 comparado com o grupo controle (ANOVA/Dunnett).

Tabela 4 – Parâmetros hematológicos dos animais tratados oralmente com o extrato aquoso de *Alibertia edulis* (EAAE).

	Toxicidade subaguda					
	Controle	125 mg/kg	250 mg/kg	500 mg/kg	1000 mg/kg	Satélite
Fêmeas						
Leucócitos (10 ³ /μL)	3.18 ± 0.85	4.01 ± 1.55	5.47 ± 0.80*	5.38 ± 0.87*	5.46 ± 0.74*	5.12 ± 0.71*
Eritrócitos (10 ⁶ /μL)	8.07 ± 0.51	7.81 ± 0.25	8.07 ± 0.14	7.93 ± 0.22	7.57 ± 0.36	7.72 ± 0.34
Hemoglobina (g/dL)	15.24 ± 0.87	14.40 ± 1.13	15.07 ± 0.30	14.90 ± 0.41	14.30 ± 0.75	14.64 ± 0.58
Hematócrito (%)	47.18 ± 3.35	46.10 ± 1.57	47.85 ± 1.25	46.92 ± 1.13	45.00 ± 2.39	45.32 ± 0.91
CHM (pg)	18.38 ± 0.13	18.44 ± 1.79	18.65 ± 0.26	18.78 ± 0.24	18.86 ± 0.15	18.64 ± 0.36
CHCM (g/Dl)	32.32 ± 0.50	31.20 ± 1.60	31.52 ± 0.53	31.74 ± 0.20	31.78 ± 0.22	32.30 ± 0.70
Plaquetas (10 ³ /μL)	786.20 ± 162.15	745.20 ± 173.03	832.75 ± 55.24	914.00 ± 172.37	1073.00 ± 236.06	835.40 ± 142.49
RCDW (%)	12.54 ± 0.41	12.64 ± 1.17	12.77 ± 0.67	12.64 ± 0.53	12.56 ± 0.54	12.58 ± 0.29
Neutrófilos segmentados (%)	23.40 ± 4.62	21.16 ± 6.79	18.37 ± 7.92	18.76 ± 6.85	26.92 ± 4.13	18.40 ± 4.97
Bastonetes (%)	1.60 ± 0.89	0.00 ± 0.00*	0.00 ± 0.00*	0.00 ± 0.00*	0.00 ± 0.00*	0.80 ± 0.83
Linfócitos (%)	71.80 ± 6.42	75.64 ± 6.65	78.62 ± 7.92	78.24 ± 6.85	70.08 ± 4.13	77.80 ± 6.76
Monócitos (%)	1.40 ± 0.55	2.20 ± 0.44*	2.00 ± 0.00	2.00 ± 0.00	2.00 ± 0.00	1.60 ± 0.54
Eosinófilos (%)	1.40 ± 0.55	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.20 ± 0.44
Basófilos (%)	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
Male						
Leucócitos (10 ³ /μL)	5.16 ± 1.21	6.35 ± 0.98	4.16 ± 1.39	5.22 ± 0.70	4.72 ± 1.19	4.60 ± 1.30
Eritrócitos (10 ⁶ /μL)	8.58 ± 0.23	7.83 ± 0.44*	7.92 ± 0.22*	8.28 ± 0.43	8.04 ± 0.55	8.47 ± 0.24
Hemoglobina (g/dL)	14.80 ± 0.44	14.20 ± 0.74	14.12 ± 0.39	14.72 ± 0.75	14.52 ± 1.06	14.77 ± 0.78
Hematócrito (%)	47.38 ± 1.81	43.80 ± 2.40	43.48 ± 1.53*	45.30 ± 2.28	43.36 ± 2.82	47.17 ± 2.29
CHM (pg)	17.12 ± 0.31	17.70 ± 0.24	17.84 ± 0.51*	17.78 ± 0.19	18.04 ± 0.38*	17.42 ± 0.69
CHCM (g/Dl)	31.04 ± 0.34	32.25 ± 0.23*	32.46 ± 0.52*	32.50 ± 0.23*	32.72 ± 0.49*	31.30 ± 0.35
Plaquetas (10 ³ /μL)	844.80 ± 99.09	922.00 ± 12.35	683.40 ± 208.67	872.00 ± 94.09	836.20 ± 32.81	789.50 ± 178.00
RCDW (%)	14.10 ± 0.46	13.80 ± 0.28	13.96 ± 0.33	14.52 ± 0.99	14.66 ± 0.44	14.85 ± 0.99
Neutrófilos segmentados (%)	25.80 ± 4.15	28.25 ± 5.56	33.40 ± 4.97	24.60 ± 0.40	32.60 ± 4.39	23.25 ± 4.27
Bastonetes (%)	3.55 ± 1.71	1.25 ± 0.50*	1.40 ± 0.54*	1.00 ± 0.00*	1.00 ± 0.00*	1.00 ± 0.00*
Linfócitos (%)	70.20 ± 4.15	66.00 ± 6.48	60.20 ± 6.22*	70.80 ± 7.85	62.60 ± 4.27	72.75 ± 4.27
Monócitos (%)	2.00 ± 0.00	3.25 ± 1.89	3.60 ± 1.14*	2.60 ± 0.54	2.80 ± 0.44	2.00 ± 0.00
Eosinófilos (%)	1.00 ± 0.00	1.25 ± 0.50	1.40 ± 0.54	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
Basófilos (%)	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00

Valores expressos pelas médias ± DP, n = 5 animais/grupo.

* p < 0.05 comparado com o grupo controle (ANOVA/Dunnett).

Tabela 5 – Parâmetros bioquímicos dos animais tratados oralmente com o extrato aquoso de *Alibertia edulis* (EAAE).

	Toxicidade subaguda					
	Controle	125 mg/kg	250 mg/kg	500 mg/kg	1000 mg/kg	Satélite
Fêmeas						
AST - Aspartato aminotransferase (U/L)	107.36 ± 33.12	84.08 ± 23.77	42.60 ± 12.94*	72.02 ± 18.85*	79.32 ± 7.06	92.04 ± 4.93
ALT- Alanina aminotransferase (U/L)	34.00 ± 5.18	35.10 ± 8.30	17.42 ± 9.08*	31.24 ± 7.72	32.44 ± 6.05	35.86 ± 6.68
Fosfatase alcalina (U/L)	52.70 ± 1.71	58.30 ± 1.39*	57.95 ± 0.85*	58.38 ± 1.29*	58.44 ± 1.59*	53.94 ± 1.48
Gama glutamil transpeptidase (U/L)	1.78 ± 1.10	2.74 ± 1.65	3.42 ± 0.55	4.20 ± 0.63*	3.82 ± 0.92*	1.14 ± 0.54
Bilirrubina total (mg/dL)	0.08 ± 0.02	0.06 ± 0.02	0.05 ± 0.01*	0.07 ± 0.01	0.08 ± 0.01	0.10 ± 0.01
Proteína total (g/dL)	6.28 ± 0.15	6.04 ± 1.36	6.51 ± 1.12	5.78 ± 0.41	6.08 ± 0.27	5.18 ± 1.89
Albumina (g/dL)	1.48 ± 0.18	2.78 ± 0.42*	3.00 ± 0.37*	2.96 ± 0.23*	3.02 ± 0.34*	1.51 ± 0.29
Uréia (mg/dL)	35.35 ± 4.63	34.38 ± 3.99	20.46 ± 6.41*	30.55 ± 4.61	32.30 ± 2.80	36.52 ± 1.61
Creatinina (mg/dL)	0.38 ± 0.08	1.38 ± 2.69	0.17 ± 0.05	0.30 ± 0.12	0.40 ± 0.07	0.36 ± 0.08
Sódio (mmol/dL)	147.04 ± 4.35	144.20 ± 2.38	141.25 ± 0.95*	143.00 ± 1.58	144.20 ± 2.48	147.46 ± 2.76
Potássio (mmol/dL)	4.84 ± 0.17	4.36 ± 0.33*	4.30 ± 0.14*	4.32 ± 0.13*	4.38 ± 0.16*	4.89 ± 0.12
Cálcio (mg/dL)	10.12 ± 0.18	9.98 ± 0.21	9.92 ± 0.12	10.08 ± 0.31	10.02 ± 0.35	27.71 ± 40.13
Colesterol (mg/dL)	74.62 ± 9.57	63.74 ± 16.70	38.18 ± 10.68*	61.18 ± 23.53	75.09 ± 2.25	73.68 ± 10.45
Triglicérides (mg/dL)	62.01 ± 13.50	46.29 ± 10.52	29.19 ± 14.15*	55.14 ± 17.01	62.70 ± 10.40	55.96 ± 10.05
Ácido úrico (mg/dL)	2.36 ± 0.51	1,96 ± 0.37	1.27 ± 0.84	1.70 ± 0.69	1.94 ± 0.55	2.30 ± 0.62
Glicose (mg/dL)	163.70 ± 40.87	149.74 ± 30.31	105.70 ± 48.12	128.26 ± 45.53	149.92 ± 32.81	200.16 ± 24.31
Machos						
AST - Aspartato aminotransferase (U/L)	73.32 ± 3.29	47.92 ± 22.72	49.90 ± 46.15	44.02 ± 8.49	54.20 ± 15.79	78.87 ± 20.45
ALT- Alanina aminotransferase (U/L)	41.88 ± 5.94	20.30 ± 10.45	18.70 ± 9.86*	19.78 ± 2.17*	26.08 ± 9.10	65.62 ± 27.65*
Fosfatase alcalina (U/L)	60.50 ± 4.28	56.62 ± 1.81	55.40 ± 2.72	56.00 ± 1.22	55.02 ± 1.13	53.75 ± 5.97*
Gama glutamil transpeptidase (U/L)	5.15 ± 1.55	3.40 ± 0.78	3.56 ± 2.13	3.36 ± 0.85	3.48 ± 1.84	7.07 ± 2.63
Bilirrubina total (mg/dL)	0.58 ± 0.13	0.20 ± 0.27	0.04 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.01 ± 0.00	0.18 ± 1.71
Proteína total (g/dL)	6.16 ± 0.21	11.84 ± 2.10*	10.24 ± 2.58*	10.26 ± 2.72*	7.96 ± 0.25	6.01 ± 0.31
Albumina (g/dL)	2.18 ± 0.08	2.15 ± 0.05	2.22 ± 0.31	2.12 ± 0.33	2.32 ± 0.17	2.17 ± 0.09
Uréia (mg/dL)	30.36 ± 1.92	19.29 ± 7.83*	22.56 ± 4.12*	20.20 ± 2.32*	23.04 ± 4.26*	27.25 ± 0.80
Creatinina (mg/dL)	0.28 ± 0.04	0.10 ± 0.08*	0.10 ± 0.07*	0.12 ± 0.08*	0.20 ± 0.07	0.22 ± 0.05
Sódio (mmol/dL)	146.42 ± 1.06	143.50 ± 2.08	143.60 ± 3.36	143.40 ± 2.30	142.80 ± 2.16	146.37 ± 3.19
Potássio (mmol/dL)	4.94 ± 0.05	4.80 ± 0.14	4.96 ± 0.42	4.14 ± 1.93	5.58 ± 0.21	4.97 ± 0.25
Cálcio (mg/dL)	9.26 ± 0.57	9.67 ± 0.32	9.84 ± 0.29*	9.94 ± 0.25*	8.88 ± 0.17	9.00 ± 0.21
Colesterol (mg/dL)	94.40 ± 40.17	53.27 ± 30.99	41.12 ± 20.91*	51.09 ± 5.04*	64.54 ± 18.14	77.25 ± 1.70
Triglicérides (mg/dL)	88.87 ± 36.21	51.31 ± 24.35	45.43 ± 7.90*	53.75 ± 15.79	71.17 ± 18.84	68.30 ± 25.42
Ácido úrico (mg/dL)	1.54 ± 0.18	1.37 ± 0.37	1.60 ± 1.00	1.56 ± 0.54	1.24 ± 0.36	2.75 ± 0.77*
Glicose (mg/dL)	219.64 ± 64.49	112.57 ± 50.59*	90.34 ± 42.58*	115.98 ± 19.00*	124.22 ± 43.52*	196.00 ± 48.33

Valores expressos pelas médias ± DP, n = 5 animais/grupo. * p < 0.05 comparado com o grupo controle (ANOVA/Dunnett).

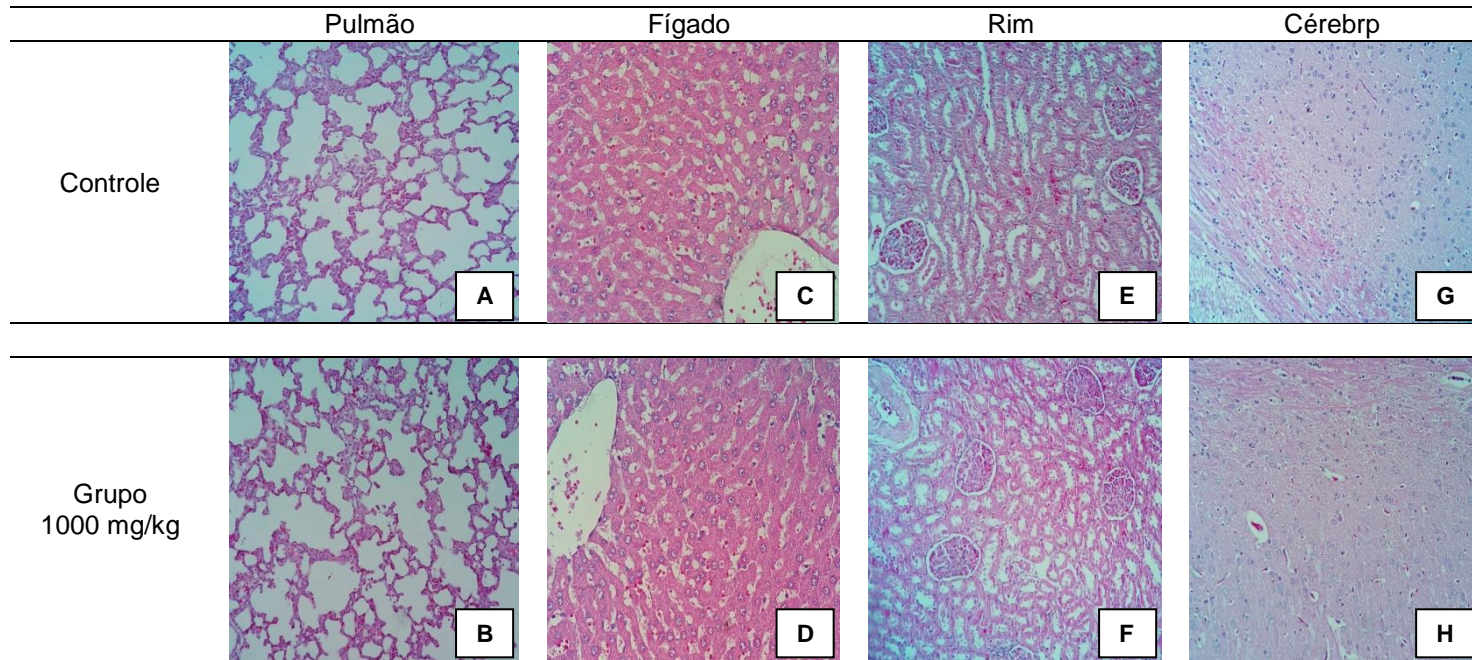


Figura 1: Avaliação histopatológica dos órgãos dos animais do grupo controle e tratados com o extrato aquoso de *A. edulis* no teste de toxicidade subaguda. (A e B) pulmão; (C e D) fígado; (E e F) rim; (G e H) cérebro. Aumentos: 20X e 40X.

5.2 Artigo submetido para periódico *Mutation Research Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*

Este trabalho deu origem ao artigo “Antioxidant and genotoxic potential of the aqueous extract of *Alibertia edulis* (Rich.) A. Rich. ex DC.” o qual foi submetido para o periódico *Mutation Research Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, qualis B1 na área de Biodiversidade, no dia 03 de novembro de 2016.

Potencial antioxidante e genotóxico do extrato aquoso das folhas de *Alibertia edulis* (Rich.) A. Rich. ex DC.

Resumo

Embora as plantas medicinais sejam importante fonte de drogas, algumas delas podem causar danos, incluindo danos ao DNA. O chá das folhas de *Alibertia edulis* são usadas na medicina popular por apresentarem efeitos hipoglicemiantes, anti-hipertensivos, antitumorais e diuréticos. No entanto, estudos sobre a genotoxicidade desta planta não estão disponíveis. MTT em plaquetas humanas, micronúcleo em medula óssea e cometa em sangue periférico foram realizados. Os testes in vivo foram realizados de acordo com as diretrizes 474 e 489 da OCDE. Os animais foram divididos em seis grupos experimentais (grupos I-VI). O veículo (solução salina) foi administrado por gavagem ao grupo de controle negativo. O grupo de controle positivo recebeu uma injeção intraperitoneal de ciclofosfamida. Quatro grupos de animais receberam quatro doses (125, 250, 500 e 1000 mg/kg) do extrato aquoso de *A. edulis* (EAAE) por gavagem durante 28 dias consecutivos. Observações clínicas como comportamento, peso corporal e consumo de ração e água foram observadas. A medula óssea de amostras de fêmur e amostras de sangue via punção caudal foram coletadas para os ensaios de micronúcleo e cometa, respectivamente. O estudo foi realizado em 5 meses, no qual o primeiro mês foi destinado à obtenção de extrato bruto, o segundo mês para tratamento animal e os últimos três meses para leitura de slides e análise de dados. Através do ensaio MTT, o EAAE não mostrou efeitos tóxicos nas plaquetas humanas durante o período de incubação. O ensaio do cometa mostrou que todas as doses do EAAE foram estatisticamente semelhantes ao grupo de controle negativo uma vez que não induziram qualquer aumento significativo do número total de células danificadas nem na gravidade do dano celular. No ensaio de micronúcleo, os resultados demonstram que o EAAE não aumentou a produção de eritrócitos policromáticos micronucleados e foi estatisticamente semelhante ao controle negativo. Além disso, as quatro doses do extrato não afetaram a produção de novos eritrócitos e foram estatisticamente semelhantes aos grupos controle negativo. Estes dados demonstram que o EAAE não tem citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade nas

doses testadas *in vivo* e em modelos experimentais *in vitro*. No entanto, outros estudos devem ser realizados de modo a prosseguir para estudos clínicos.

Palavras-chave: marmelo do Cerrado, medicina popular brasileira, micronúcleo, cometa, ciclofosfamida, genotoxicidade.

Abreviaturas: EAAE, extrato aquoso de *Alibertia edulis* leaves; CL⁵⁰, concentração letal; MN-PCEs, eritrócitos policromados micronucleados.

1. Introdução

As plantas medicinais têm sido utilizadas como fonte importante de medicamentos e como alternativa à medicina alopática (Oliveira et al., 2011). Uma vez que os extratos vegetais brutos podem conter uma ampla diversidade de moléculas com efeitos biológicos muitas vezes desconhecidos, as plantas medicinais tornaram-se o foco de inúmeros estudos para avaliar sua segurança e validar os usos tradicionais.

Alibertia edulis (Rich.) A. Rich. Ex DC, popularmente conhecida como "marmelo do Cerrado", é uma planta nativa do Cerrado brasileiro e amplamente distribuída no Brasil. Tem potencial ornamental e seus frutos são fonte de alimento para a população local (Marin, 2006). O chá das folhas de *A. edulis* são usadas na medicina popular, pois apresentam propriedades anti-hipertensivas, diuréticas, hipoglicemiantes e antitumorais (Rieder, 2013; Marques et al., 2013). Os efeitos farmacológicos de *A. edulis* foram estudados devido à presença de compostos triterpênicos nas folhas (Brochini et al., 1994).

Estudos recentes sobre os efeitos farmacológicos do extrato aquoso de folhas de *A. edulis* (EAAE) mostraram seu alto potencial hipotensivo e anti-hipertensivo quando testados em ratos normotensos e hipertensos (Aquino et al., 2016). Uma análise fitoquímica do EAAE revelou a presença de flavanonas, fenóis e saponinas heterosídicas. Em relação ao potencial toxicológico de *A. edulis*, estudos demonstram a baixa toxicidade desta espécie em ratos quando expostos a avaliações de toxicidade aguda e subcrônica (Menegati et al., 2016).

Sabe-se que agentes químicos e biológicos podem interagir com DNA e promover mutações. Considerando isso, a eficácia e potencial toxicidade das plantas medicinais empregadas na medicina popular devem ser avaliadas cientificamente (Singh et al., 1988). Por essa razão, os ensaios de genotoxicidade começaram a ser requeridos por agências

reguladoras como a FDA e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) como parte essencial da validação de medicamentos (Hartmann, 2004).

O MTT é um ensaio colorimétrico que indica atividade metabólica celular (Mosmann, 1983); Os ensaios de cometa e micronúcleo são testes eficazes para determinar o potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico de uma substância. Estes testes servem de base para a validação da segurança de compostos naturais e para o desenvolvimento de novos fármacos (Li et al., 2011). Como não há relatos na literatura sobre o potencial genotóxico desta espécie, este estudo teve como objetivo investigar os potenciais citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos do EAAE para validar a segurança desta planta.

2. Materiais e Métodos

2.1 Coleta da planta, identificação e preparo do extrato

Folhas de *Alibertia edulis* (Rich.) A. Rich. Ex DC. foram coletados em uma área do Cerrado de Dourados, Mato Grosso do Sul (latitude 22°08'05 " Sul e longitude 55°08'17 " Oeste), de acordo com a licença de acesso e transporte de amostras de recursos genéticos nº 010220 / 2015- 1 - CNPq / CGEN / MMA. Uma exsicata foi autenticada pela Dr^a. Zefa Valdevina Pereira e depositado no herbário da Universidade Federal de Grande Dourados (UFGD) sob o número 4649.

As folhas secas (58,1% de umidade) e pulverizadas (granulometria ≤ 1 mm) de *A. edulis* foram suspensas em água destilada (1:10 m / v) e fervidas (97°C) por 15 min. A decocção obtida foi filtrada, congelada a -70 ° C, liofilizada (rendimento: 36,9% p / p) e armazenada num congelador a -18 ° C (Coe et al., 2010). O EAAE liofilizado foi utilizado para realizar o MTT e os ensaios *in vivo*. Para a análise dos compostos bioativos e da atividade antioxidante, o EAAE liofilizado foi diluído em metanol.

2.2 Compostos bioativos e análise antioxidante

2.2.1 Flavonoides, taninos condensados e compostos fenólicos

Para a avaliação de flavonoides, seguiu-se o método descrito por Chang et al., (2002) com modificações. O extrato foi reagido com cloreto de alumínio e as leituras foram realizadas num espectrofotômetro a 415 nm. Os resultados foram expressos como equivalente de quercetina em mg.100g⁻¹ da amostra (QE mg.100g⁻¹) utilizando a quercetina como padrão.

A análise dos taninos foi realizada de acordo com o método de espectrofotometria descrito por Maxson & Rooney (1972), com modificações. As leituras foram realizadas após 20 minutos utilizando um espectrofotômetro a 500 nm e utilizou-se solução de vanilina como o branco. Os resultados foram expressos como equivalente de catequina em mg.100g⁻¹ de amostra (CE mg.100g⁻¹) utilizando a catequina como padrão.

A quantidade de compostos fenólicos no extrato foi determinada de acordo com o método de espectrofotometria utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu descrito por George et al. (2005). As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a um comprimento de onda de 760 nm. Os resultados foram expressos como equivalente de ácido gálico em mg.100g⁻¹ de amostra (GA mg.100g⁻¹) utilizando a curva padrão de ácido gálico.

2.2.2 Atividade antioxidante pelo método DPPH• e ABTS•+

As determinações quanto à capacidade de eliminar os radicais livres ABTS + do extrato foram conduzidas de acordo com a metodologia descrita por Rufino et al. (2010), com modificações. A absorbância das amostras e a leitura foram avaliadas em espectrofotômetro a 734 nm. Trolox e vitamina C foram utilizados como padrão e os resultados foram expressos em percentagem (%) de inibição.

A atividade de eliminação de radicais DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) do extrato foi determinada de acordo com o método proposto por Rufino et al. (2010), com modificações. A absorbância foi monitorizada a 517 nm. A vitamina C foi utilizada como padrão e os resultados foram expressos em percentagem (%) de inibição.

2.3 MTT [(3-(4,5-dimethylazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)]

2.3.1 Obtenção do lavado plaquetário

O sangue venoso periférico foi colhido de voluntários saudáveis que não tinham tomado nenhum medicamento durante 10 dias. A coleta de sangue foi realizada com ACD-C (citrato de sódio 12,4 mM, ácido cítrico 13 mM, glucose 11 mM, 9: 1 v/v). O plasma rico em plaquetas (PRP) foi obtido por centrifugação de sangue total a 400xg à temperatura ambiente durante 12 min. O PRP foi então centrifugado a 800xg à temperatura ambiente, durante 12 min e o sobrenadante foi descartado. O resíduo de plaquetas foi cuidadosamente ressuspenso em solução de Krebs-Ringer desprovida de cálcio (NaCl 118 mM, NaHCO₃ 35 mM, KCl 4,7 mm, KH₂PO₄ 1,2 mM, MgSO₄.7H₂O

1,17 mM e glucose 5,6 mM). O número de plaquetas foi ajustado para $1,2 \times 10^8$ plaquetas/mL por contagem manual utilizando uma câmara de Neubauer.

2.3.2 Determinação da viabilidade plaquetária pelo método MTT

Para avaliar a toxicidade *in vitro* do EAAE sobre plaquetas pelo método MTT (brometo de 3-(4,5-dimetizol-zil)-2,5-difeniltetrazólio), seguiu-se a metodologia descrita por Mosmann (1983) com algumas modificações. Em placas de 96 poços contendo suspensões de plaquetas ($1,2 \times 10^8$ platelets/mL, 50 μ L), o extrato foi incubado (0,5, 1, 10, 25 and 50 μ g/mL) durante 5 min, 15 min, 30 min e depois 60 min. Após o período de incubação, adicionou-se solução de Krebs-Ringer em cada poço para atingir um volume final de 10 μ L e depois adicionou-se 10 μ L de MTT (5 mg / ml) a cada poço. Após incubação durante 3 h, a 37°C, adicionou-se 100 μ L de SDS a 10% em HCl (0,01 M) para interromper a reação. Após 1 h, a placa foi lida num leitor de microplacas (Synergy™ Hybrid Reader, Biotek, EUA) a um comprimento de onda de 540 nm. Triton 10% foi utilizado como controle positivo.

2.4 Ensaios *in vivo*

Os ensaios *in vivo* foram realizados seguindo os protocolos recomendados pela Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE) com algumas modificações. Todos os procedimentos envolvendo animais foram realizados de acordo com os Princípios Éticos em Pesquisa Animal e aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Grande Dourados (protocolo: 29/2015).

2.4.1 Animais

Nesta pesquisa, foram utilizados ratos e ratas da linhagem Wistar (8-12 semanas, 180-250 g fêmeas, 350-450 g machos). Os animais foram mantidos em condições padronizadas (23 °C e 12 horas ciclo claro e escuro) e tinham livre acesso a ração comercial e água filtrada (OECD, 2014).

Os ratos foram divididos em seis grupos experimentais de dez animais cada (cinco machos e cinco fêmeas). O Grupo I foi estabelecido como o grupo de controle negativo, ao qual foi administrada solução salina por gavagem. O Grupo II foi estabelecido como o grupo de controle positivo ao qual foi administrada uma injeção intraperitoneal de ciclofosfamida monohidratada (20 mg/kg i.p.) 48 horas antes de serem submetidos a

eutanásia. Outros quatro grupos de animais foram estabelecidos (grupos III, IV, V e VI) aos quais foram administradas quatro diferentes doses do EAAE (125, 250, 500 e 1000 mg/kg p.o.). Todas as doses do extrato foram administradas por gavagem durante 28 dias consecutivos. As doses foram escolhidas com base nos nossos estudos de toxicidade aguda e subcrônica.

No final do experimento, todos os animais utilizados neste estudo foram sacrificados por anestesia com isoflurano (inalação) seguida de exsanguinação. Amostras de sangue por punção caudal e medula óssea femoral foram coletadas para os ensaios cometa e micronúcleo, respectivamente.

2.4.2 Observações clínicas gerais

De acordo com a OECD (2014), para estudos de maior duração, as observações clínicas gerais relacionadas com a saúde dos animais devem ser feitas e registradas uma vez por dia. O peso corporal e o consumo de ração e água devem ser medidos pelo menos uma vez por semana. Portanto, o comportamento e quaisquer outros sinais gerais de toxicidade foram cuidadosamente observados e registrados diariamente. O peso corporal, o consumo de água e alimentos foram registrados semanalmente.

2.4.3 Ensaio cometa

Este teste foi realizado de acordo com a diretriz da OCDE 489 (OECD, 2014) com algumas modificações. As amostras de sangue foram coletadas por punção caudal de cada rato com uma agulha embebida em heparina. Uma gota de sangue foi transferida para um micro-tubo contendo 120 µl de 1,5% de agarose de baixo ponto de fusão a 37°C. A mistura foi transferida para lâminas pré-revestidas com agarose padrão a 5%. As lâminas foram cobertas com lamínulas e mantidas no escuro a 3°C durante 20 minutos. As lâminas foram codificadas para que o marcador não tenha conhecimento da condição de tratamento (OCDE, 2014).

As lamínulas foram então removidas e as lâminas foram imersas em solução de lise durante 1 hora a 3°C no escuro. Após 1 hora, as lâminas foram colocadas na unidade de electroforese (Loccus) contendo solução alcalina a 4°C durante 20 min no escuro, a fim de permitir a desnaturação do DNA.

A eletroforese foi realizada em câmara escura, a 4°C durante 20 min a 300 mA e 25 V. Após a corrida, as lâminas foram submersas em tampão de neutralização (pH 7,5) durante três ciclos de 5 min cada, secas, fixadas com álcool etílico por 10 minutos. As

lâminas foram depois armazenadas durante a noite à temperatura ambiente. Após este período, as lâminas foram coradas com brometo de etídio (0,002 mg / mL) e cobertas com uma lamínula. Todos os materiais foram analisados por microscopia de fluorescência (Nikon - H550S - ampliação 40X), equipado com um filtro de excitação (420-490 nm) e um filtro de barreira (520 nm).

Este ensaio foi realizado para avaliar a frequência de danos e o índice de danos causados ao DNA. Os núcleos individuais foram analisados e a extensão do dano ao DNA foi avaliada após análise de 100 células por animal. A extensão do DNA que migrou durante a eletroforese e a distância de migração reflete a quantidade e o tamanho dos fragmentos de DNA (Silva et al., 2010). Os achados do cometa foram classificados como não danificados (classe 0), ligeiramente danificados (classe 1), mais danificados (classe 2) e altamente danificados (classe 3) (Silva et al., 2010). O índice de danos (ID) foi calculado multiplicando o número de células danificadas pelo valor atribuído a este dano e variando de 0 (nenhum dano: 0 x 100 células) a 300 (dano máximo: 3 x 100 células). A frequência de dano (FD) foi calculada somando o número de células danificadas (classe 1, 2 ou 3) e variou de 0 (nenhum dano) a 100 (dano máximo).

2.4.4 Ensaio de micronúcleo em medula óssea

Este ensaio foi realizado de acordo com o guia 474 da OECD (OCDE, 2014) com algumas modificações. A medula óssea femoral de todos os animais foi lavada em 1 ml de solução de soro bovino fetal (FBS) e centrifugada (Spinlab - SL - 5AM) durante 5 minutos a 1000 rpm. Os esfregaços foram fixados com álcool metílico absoluto durante 10 minutos, corados com Giemsa durante 15 minutos e armazenados para posterior análise (OCDE, 2014).

Para avaliar o efeito mutagênico do EAAE, 2000 eritrócitos policromáticos (PCE) foram avaliados por animal quanto à presença ou ausência de micronúcleos. Para a detecção de quaisquer efeitos citotóxicos, 200 eritrócitos aleatórios foram analisados por animal, a fim de avaliar a relação entre eritrócitos policromáticos e eritrócitos normocromáticos (PCE/NCE). As células foram analisadas por microscópio óptico (Olympus - CX41) sob ampliação de 1000x.

2.5 Avaliação macroscópica

Neste estudo, os órgãos alvo (coração, pulmão, baço, fígado e rim) foram removidos e examinados macroscopicamente a fim de observar quaisquer alterações.

2.6 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm DP. As diferenças entre os grupos foram determinadas pela análise de variância (ANOVA unidirecional) seguida pelo teste de Tukey. Valores de P inferiores a 0,05 foram definidos como o nível de significância.

3 Resultados

3.1 Compostos bioativos e atividade antioxidante

A análise de compostos bioativos do EAAE liofilizado diluído em metanol apresentou as seguintes quantidades: 16857,64 \pm 0,35 mg/g por amostra amostra para flavonóides, 5428,98 \pm 0,92 mgGAE/g por amostra amostra para compostos fenólicos e 26558,77 \pm 0,15 mg CATE/g por amostra de taninos condensados. Em relação à atividade antioxidante, através do ensaio DPPH •, o extrato apresentou uma inibição máxima de 250 microgramas/mL, semelhante ao ácido ascórbico (Figura 1). Pelo método ABTS •+, o extrato apresentou uma inibição máxima a 100 μ g/mL (Figura 2), semelhante aos controles positivos trolox e ácido ascórbico.

3.2 Ensaio de MTT

O tratamento com o EAAE a concentrações de 0,5, 1,0, 10,0, 25,0 e 50,0 μ g/mL não mostrou efeitos tóxicos nas plaquetas humanas durante o período de incubação de 5, 15, 30 e 60 min (Figura 3).

3.3 Observações clínicas gerais

Quanto às avaliações clínicas, os animais permaneceram ativos e não apresentaram alterações de comportamento quando estimulados. O consumo de ração e os valores de ganho de peso corporal dos grupos tratados oralmente com o EAEA não diferiram estatisticamente quando comparados com o grupo de controle negativo.

3.4 Ensaio de micronúcleo em medula óssea

Os grupos controle negativo (grupo I – solução salina) apresentaram média de 2,2 \pm 0,37 e 3,0 \pm 0,31 de eritrócitos policromáticos micronucleados (MNPCEs) para ratos e ratas, respectivamente. Os grupos controle positivo (grupo II - ciclofosfamida monohidratada) apresentaram média de 11,60 \pm 0,81 e 12,0 \pm 0,83 de MNPCEs para ratos

e ratas, respectivamente. Todos os grupos tratados com o EAAE (grupos III-VI) foram estatisticamente semelhantes ao grupo de controle negativo (Figura 4).

O grupo controle positivo, como esperado, diminuiu a produção de novos eritrócitos. A proporção estimada de PCE/NCE nas preparações de medula óssea não mostrou alterações estatísticas na eritropoese após a administração da EAAE. Portanto, os grupos tratados com o EAAE foram estatisticamente semelhantes aos grupos controle negativo (Figura 5).

3.5 Ensaio cometa

De acordo com os dados obtidos neste teste, os grupos controle negativo apresentaram baixa frequência (Figura 6), bem como baixo índice de danos ao DNA (Figura 7). Por outro lado, a ciclofosfamida monohidratada aumentou significativamente a frequência, assim como o índice de lesão ao DNA nas células testadas (Grupo II: 20 mg/kg i.p.) quando comparado com o grupo de controle negativo (Figuras 6 e 7). Todas as doses do EAAE (125, 250, 500 e 1000 mg/kg) foram estatisticamente semelhantes ao grupo de controle negativo uma vez que não induziram qualquer aumento significativo do número total de células danificadas (Figura 6) nem da gravidade do dano celular (Figura 7).

3.6 Avaliação macroscópica

Na necropsia, os órgãos alvo (coração, pulmão, baço, fígado e rim) de todos os ratos foram removidos e examinados macroscopicamente. Não foram observadas alterações significativas em nenhum dos órgãos examinados (Figura 8).

4 Discussão

O chá das folhas de *A. edulis* é popularmente utilizado por apresentar efeito hipoglicemiante, anti-hipertensivo, diurético e antitumoral (Rieder, 2013; Marques et al., 2013). Estudos prévios sobre o potencial farmacológico do gênero *Alibertia* mostraram suas atividades antitumorais, citotóxicas e antioxidantes (Gupta et al., 1996; Gadelha Militao et al., 2005; Rocha, 2011). Estudos recentes realizados em ratos normotensos e hipertensos revelaram seu alto potencial hipotensivo e anti-hipertensivo. Uma análise fitoquímica da EAAE revelou a presença de flavanonas, fenóis e heterosídeos saponínicos

(Aquino et al., 2016). Alguns destes compostos, tais como flavanonas, são substâncias com importante capacidade antioxidante (Young et al., 1992).

A avaliação de compostos bioativos do EAAE liofilizado mostrou altos teores de compostos fenólicos ($26558,77 \pm 0,15$ mg CATE/g de amostra), flavonóides ($16857,64 \pm 0,35$ mgCOg/g de amostra) e taninos condensados ($26558,77 \pm 0,15$ mg CATE/g de amostra). Os compostos fenólicos têm propriedades antioxidantes e são capazes de reduzir o estresse oxidativo, que está intimamente associado com doenças cardíacas e câncer (Amarowicz & Pegg, 2008). Os flavonóides podem ser responsáveis pela prevenção do câncer (Ejaz, Ejaz, Matsuda, & Chae, 2006) e os taninos condensados têm propriedades antimicrobianas e antivirais comprovadas (Kakiuchi et al., 1986, Tomiyama et al., 2016).

A avaliação da atividade antioxidante do EAAE utilizando o método DPPH (Figura 1) mostrou que o extrato a uma concentração de 250 $\mu\text{g/mL}$ apresenta sua máxima inibição, não diferindo estatisticamente do ácido ascórbico (controle positivo). Pelo método ABTS, o extrato mostrou actividade anti-radical semelhante ao ácido ascórbico a uma concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$. No entanto, quando comparado ao controle positivo Trolox, o extrato apresentou maior atividade e diferiu estatisticamente entre si (Figura 2). Estes dados mostram que esta espécie tem alto potencial antioxidante. Plantas medicinais com atividade antioxidante são de suma importância na toxicologia genética, visto que espécies reativas de oxigênio pode causar danos às cadeias de DNA. Evidências sugerem que o dano acumulado no DNA causado por espécies reativas é muito relevante para o metabolismo celular e contribui para várias condições clínicas adversas, como o câncer (Totter, 1980). Por esta razão, o uso de antioxidantes está associado a potenciais efeitos anticancerígenos, uma vez que protege o DNA contra a ação dos radicais livres e pode prevenir ou retardar o aparecimento de alguns tipos de câncer (Diplock, 1994).

MTT é um ensaio colorimétrico que indica actividade metabólica celular. As reações redox ocorrem nas mitocôndrias e citosol, onde a redução de sal de MTT para cristais de formazano por succinato desidrogenase resulta em cristais insolúveis violeta. Tendo esses cristais insolúveis, a intensidade da coloração é utilizada para medir a atividade mitocondrial e, portanto, a viabilidade celular (Mosmann, 1983). Os efeitos sobre a atividade metabólica do EAAE em plaquetas humanas foram investigados pelo ensaio de MTT, assim a viabilidade de plaquetas não tratadas (controle negativo- basal) foi considerada 100%. O tratamento com o EAAE não mostrou efeitos significativos no metabolismo das plaquetas durante o tempo de incubação. Como esperado, o controle

positivo (Triton 10%) teve influência significativa no metabolismo das plaquetas (Figura 3). Estes resultados mostram que o extrato não alterou a viabilidade celular das plaquetas, portanto, não afetou sua funcionalidade no tempo estudado. O cometa alcalino e ensaios de micronúcleo são testes eficazes para determinar a citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade de compostos naturais. O ensaio de micronúcleo na medula óssea avalia a presença de micronúcleos para avaliar a capacidade mutagênica do extrato vegetal. O ensaio do cometa proporciona uma detecção de largo espectro dos níveis de danos ao DNA, tais como a desnaturação do DNA (Singh et al., 1988, Collins et al., 2008). Os ensaios complementam-se uma vez que são muito sensíveis e detectam rupturas nos níveis cromossômico e cromatídicos (Araldi et al., 2015).

Como ambos os testes são comparativos, a presença simultânea de grupos controle positivo e negativo é obrigatória (Ribeiro, Salvadori & Marques, 2003). De acordo com os protocolos da OCDE, um grupo de animais tratados com uma substância de controle positivo deve ser incluído em cada teste. Neste estudo, a ciclofosfamida foi aplicada em ambos os testes, uma vez que tem sido amplamente utilizado como controle positivo para ensaios de toxicologia genética, uma vez que demonstrou danos no DNA nos animais tratados. O veículo (solução salina) foi administrado ao grupo de controle negativo.

O ensaio de micronúcleo na medula óssea avalia a presença ou ausência de danos causados por uma substância em cromossomos e/ou aparelhos mitóticos de eritroblastos (Samanta, 2012). Este teste in vivo é altamente recomendado pelas agências reguladoras, uma vez que avalia a toxicologia genética para fornecer resultados citotóxicos e mutagênicos. De acordo com os dados obtidos com este teste, o grupo monohidrato de ciclofosfamida (grupo II: 20 mg/kg i.p.), como esperado, mostrou um grande número de MN-PCEs (Figura 4). No entanto, os grupos tratados com quatro diferentes doses do EAAE não mostraram diferenças estatísticas quando comparados ao grupo controle negativo, uma vez que não aumentaram a produção de MN-PCEs (Figura 4).

O grupo controle positivo (grupo II) diminuiu a produção de novos eritrócitos (Figura 5). Estes dados foram obtidos através da proporção de eritrócitos policromáticos e normocromáticos de medula óssea de ratos tratados com ciclofosfamida intraperitonealmente. Aqueles que receberam o EAAE (grupos III-VI) não tiveram a produção de novos eritrócitos afetados e foram estatisticamente semelhantes aos grupos controle negativo (grupo I) (Figura 5).

O ensaio do cometa é um método sensível e confiável para a detecção de danos nas cadeias de DNA. Estas lesões detectadas por ensaio de cometas são ainda susceptíveis

de correção e por esta razão é genotóxica e não mutagênica. Não há célula sem dano ao DNA, já que o próprio metabolismo celular pode gerar cerca de 1.000 lesões diárias na célula (Ribeiro, Salvadori & Marques, 2003). Este teste baseia-se na incorporação de células em agarose, suas lises em tampão alcalino e finalmente sujeição a uma corrente elétrica (Sharma et al., 2009).

De acordo com os resultados obtidos no ensaio do cometa alcalino, a ciclofosfamida (grupo II) aumentou significativamente a frequência de dano (Figura 6), bem como o índice de danos ao DNA (Figura 7). Todas as doses de EAEE (grupos III-VI) não aumentaram a frequência normal de danos, índice de danos do DNA e foram, portanto, estatisticamente semelhantes aos grupos controle negativo (grupo I). Estes dados mostram que o EAEE não aumentou o número total de células danificadas (Figura 6) e a sua gravidade (Figura 7). Os resultados obtidos pelos modelos *in vivo* apresentados neste estudo estão de acordo com estudos recentes sobre genotoxicidade realizados com outras espécies de Cerrado (*Attalea phalerata* Mart. e *Caryocar brasiliense* Cambess.) no sangue periférico e medula óssea por meio de testes de cometas e micronúcleos, respectivamente (Lima et al., 2016, Traesel et al., 2016).

O exame macroscópico é muito importante para avaliar a presença de possíveis efeitos tóxicos nos órgãos-alvo. Ele fornece informações relevantes sobre a toxicidade de uma substância através da presença de inflamação, cor e alterações de forma (OCDE, 2014). A necropsia no final do período experimental não revelou alterações significativas em nenhum órgão-alvo (Figura 8). Não foram observados sinais de toxicidade, nem alterações de comportamento, ganho de peso corporal e consumo de água e ração. Este estudo demonstra que a EAEE não alterou a viabilidade celular das plaquetas e não apresentou citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade nas doses testadas em ratos. No entanto, outros estudos (tais como toxicidade reprodutiva) devem ser realizados de modo a prosseguir para estudos clínicos.

Apoio financeiro

Este trabalho foi financiado pela CAPES, FUNDECT e CNPq.

Referências

Amarowicz, R., Pegg, R. B., 2008. Legumes as a source of natural antioxidants. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 10 (10), 865-878.

- Aquino, D. F. de S., Tirloni, C. A. S., Menegati, S. E. L. T., Cardoso, C. A. L., Heredia-Vieira, S. C., Vieira, M. C., Simonet, A. M., Domínguez, F. A. M., Gasparotto-Junior, A. *Alibertia edulis* (L.C. Rich.) A.C. Rich - a potent diuretic arising from Brazilian indigenous species. *J Ethnopharmacol.* 2016, In Press.
- Araldi, R. P., Melo, T. C., Mendes, T. B., de Sa Junior, P.L., Nozima, B. H., Ito, E. T., 2015. Using the comet and micronucleus assays for genotoxicity studies: A review. *Biomed Pharmacother.* 72, 74-82.
- Brochini, C. B., Martins, D., Roque, N. F., Bolzani, V. da S., 1994. An oleanane acid from *Alibertia edulis*. *Phytochemistry.* 36, 1291-1295.
- Chang, C. C., Yang, M. H., Wen, H. M., Chern, J. C., 2002. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *J Food Drug Anal.* 10(3), 178-182.
- Coe, F. G., Parikh, D. M., Johnson, C. A., 2010. Alkaloid presence and brine shrimp (*Artemia salina*) bioassay of medicinal species of eastern Nicaragua. *Pharm. biol.* 48(4), 439-445.
- Collins, A. R., Oscoz, A. A., Brunborg, G., Gaivao, I., Giovannelli, L., Kruszewski, M., 2008. The comet assay: topical issues. *Mutagenesis.* 23(3), 143-51.
- Da Silva, C. J., dos Santos, J. E., Satie Takahashi, C., 2010. An evaluation of the genotoxic and cytotoxic effects of the anti-obesity drugs sibutramine and fenproporex. *Hum. Exp. Toxicol.* 29(3), 187-97.
- Diplock, A. T., 1994. Antioxidants and diseases prevention. *Mol. Aspects Med.* 15, 293-376.
- Ejaz, S., Ejaz, A., Matsuda, K., Chae, W. L. (2006). Limonoids as cancer chemopreventive agents. *J. Sci. Food Agr.* 86, 339-345.
- Gadelha Militao, G. C., ÓPessoa, C., Costa-Lotufo, L.V., Moraes, M. E. A., Moraes, M. O., Luciano, J. H. S., Lima, M. A. S., Silveira, E. R., 2005. Cytotoxicity of flavonoids isolated from *Alibertia myrciifolia*. *Pharm. biol.* 43(5), 480-484.
- George, S., Brat, P., Alter, P., Amiot, M. J., 2005. Rapid determination of polyphenols and vitamin c in plant-derived products. *J. Agric. Food Chem.* 53(5), 1370-1373.
- Gupta, M. P., Monge, A., Karikas, G. A., Cerain, A. L., Solis, P.N., Leon, E., Trujillo, M., Suarez, O., Wilson, F., Montenegro, G., Noriega, Y., Santana, A. I., Correa, M., Sanchez, C., 1996. Screening of panamanian medicinal plants for brine shrimp toxicity, crown gall tumor inhibition, cytotoxicity and DNA intercalation. *Int. J. Pharmacogn.* 34(1), 19-27.
- Hartmann, A., 2004. Use of the alkaline in vivo Comet assay for mechanistic genotoxicity Investigations. *Mutagenesis.* 19, 51-59.

- Kakiuchi, N., Hattori, M., Nishizawa, M., Yamagishi, T., Okuda, T., Namba, T., 1986. Studies on dental caries prevention by traditional medicines. VIII. Inhibitory effect of various tannins on glucan synthesis by glucosyltransferase from *Streptococcus mutans*. *Chem. Pharmaceutical Bull.* 34, 720-725.
- Li, S., Zhang, B., Zhang, N., 2011. Network target for screening synergistic drug combinations with application to traditional Chinese medicine. *BMC Syst Biol.* 5, 1-10.
- Lima, F. F., Menegati, S. E. L. T., Traesel, G. K., Araújo, F. H. S., Lescano, C. H., Peixoto, S. M., Silva, F. A. M., Heredia Vieira, S. C., Vieira, M. C., Oesterreich, S. A., 2016. 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(10).
- Marin, A. M. F., 2006. Pontencial nutritivo de frutos do cerrado: composição em minerais e componentes não convencionais. 121 f. [Dissertação - Mestrado]. Universidade de Brasília.
- Marques, M. C. S., Hamerski, L., Garcez, F. R., Tieppo, C., Vasconcelos, M., Torres-Santos, E. C., Garcez, W. S., 2013. In vitro biological screening and evaluation of free radical scavenging activities of medicinal plants from the Brazilian Cerrado. *J. Med. Plant. Res.* 7(15), 957-962.
- Martín, M. A.; Ramos, S.; Mateos, R.; Marais, J. P.; Bravo-Clemente, L.; Khoo, C.; Goya, L., 2015. Chemical characterization and chemo-protective activity of cranberry phenolic powders in a model cell culture. Response of the antioxidant defenses and regulation of signaling pathways. *Food Res Int.* 71, 68-82.
- Martins, M. do R., Arantes, S., Candeias, F., Tinoco, M.T., Cruz-Morais, J., 2014. Antioxidant, antimicrobial and toxicological properties of *Schinus molle* L. essential oils. *J Ethnopharmacol.* 151(1), 485-92.
- Maxson E.D., & Rooney L.W. (1972). Evaluation of methods for tannin analysis in sorghum grain. *Cereal Chem.* 49, 719-729.
- Menegati, S. E. L. T.; Lima, F. F., Traesel, G. K., Souza, R. I. C., Santos, A. C., Oliveira, V. S., Aquino, D. F. de S., Heredia-Vieira, S. C., Cardoso, C. A. L., Vieira, M. C., Oesterreich, S. A., 2016. Acute and subacute toxicity of the aqueous extract of *Alibertia edulis* (L.C. Rich.) A.C. Rich. in rats. *J Ethnopharmacol.* 2016, In Press.
- Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 16, 65(1-2), 55-63.
- OECD. Test No. 489: In vivo mammalian alkaline comet assay: OECD Publishing.
- OECD. Test No. 474: Mammalian erythrocyte micronucleus test: OECD Publishing.
- Oliveira, A. K. M., Oliveira, N. A., Resende, U. M., Martins, P. F., 2011. Ethnobotany and traditional medicine of the inhabitants of the Pantanal Negro sub-region and the

raizeiros of Miranda and Aquidauna, Mato Grosso do Sul, Brazil. *Braz. J. Bio.* 71, 283-289.

Ribeiro, L. R., Salvadori, D. M. F., Marques, E. K., 2003. *Mutagênese Ambiental*. 1ª ed. Rio Grande do Sul: ULBRA Editora.

Rieder, A., 2013. Plants used for diabetes in the transition zone of Platinum and Amazon Hydrographic Basins, southwest portion of Mato Grosso, Brazil. *Planta Med.* 79(13), 8.

Rocha, M. S., 2011. *Compostos bioativos e atividade antioxidante in vitro de frutos do Cerrado piauiense*. 93 f. [Dissertação - Mestrado]. Universidade Federal do Piauí.

Samanta, S., Dey, P., 2012. Micronucleus and its applications. *Diagn Cytopathol.* 40(1), 84-90.

Rufino, M. S. M., Alves, R. E., Brito, E. S., Pérez-Jiménez, J., Saura-Calixto, F., Mancini-Filho, J., 2010. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. *Food Chem.* 121, 996-1002.

Sharma, R., Singh, S., Singh, G. D., Khajuria, A., Sidiq, T., Singh, S. K., Chashoo, G., Pagoch, S. S., Kaul, A., Saxena, A. K., Johri, R. K., Taneja, S. C., 2009. In vivo genotoxicity evaluation of a plant based antiarthritic and anticancer therapeutic agente Boswellic acids in rodents. *Phytomedicine.* 16, 1112-1118.

Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R., Schneider, E. L., 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell. Res.* 175(1), 184-91.

Solis, P. N., Wright, C. W., Anderson, M. M., Gupta, M. P., Phillipson, J. D., 1993. A microwell cytotoxicity assay using *Artemia salina* (brine shrimp). *Planta Med.* 59(3), 250-252.

Stone, R., 2008. Lifting the veil on traditional Chinese medicine. *Science* 319, 709-710.

Tomiyama, K., Mukai, Y., Saito, M., Watanabe, K., Kumada, H., Nihei, T., Hamada, N., Teranaka, T., 2016. Antibacterial action of a condensed tannin extracted from astringent persimmon as a component of food addictive pancil ps-m on oral polymicrobial biofilms. *BioMed Res. Int.* 1-7.

Totter, J. R., 1980. Spontaneous cancer and its possible relationship to oxygen metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 77, 1763-1767.

Young, M. C. M., Braga, M. R., Dietrich, S. M. C., Gottlieb, H. E., Trevisan, L. M. V., Bolzani, V. Da S., 1992. Fungitoxic non-glycosidic iridoids from *Alibertia macrophylla*. *Phytochemistry.* 31(10), 3433-3435.

Traesel, G. K., Araujo, F. H. S., Castro, L. H. A., Lima, F. F., Menegati, S. E. L. T., Justi, P. N., Kassuya, C. A. L., Argandoña, E. J. S., Oesterreich, S. A. Safety assessment of oil from pequi (*Caryocar brasiliense* Cambess.): evaluation of the potential genotoxic and mutagenic effects. *PloS ONE*, 2016, In Press.

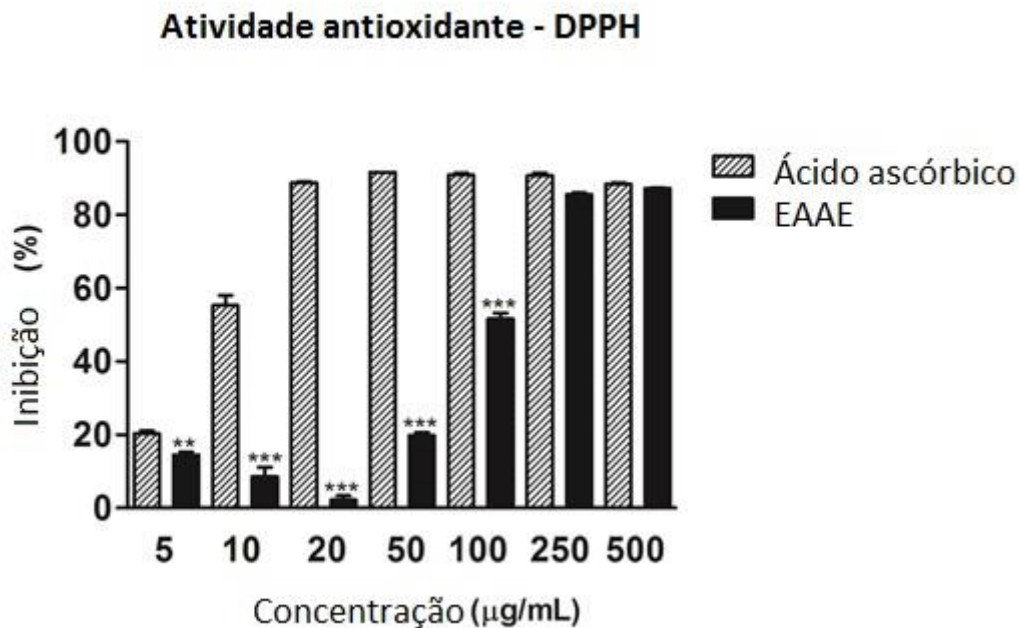


Figura 1. Efeito antioxidante do EAAE diluído em metanol e ácido ascórbico (controle positivo). Os resultados são apresentados como média \pm D.P. em triplicata. Realizou-se ANOVA unidireccional seguida pelo teste de Tukey ($p \leq 0,001$). * 0,05 ** 0,01 *** 0,001.

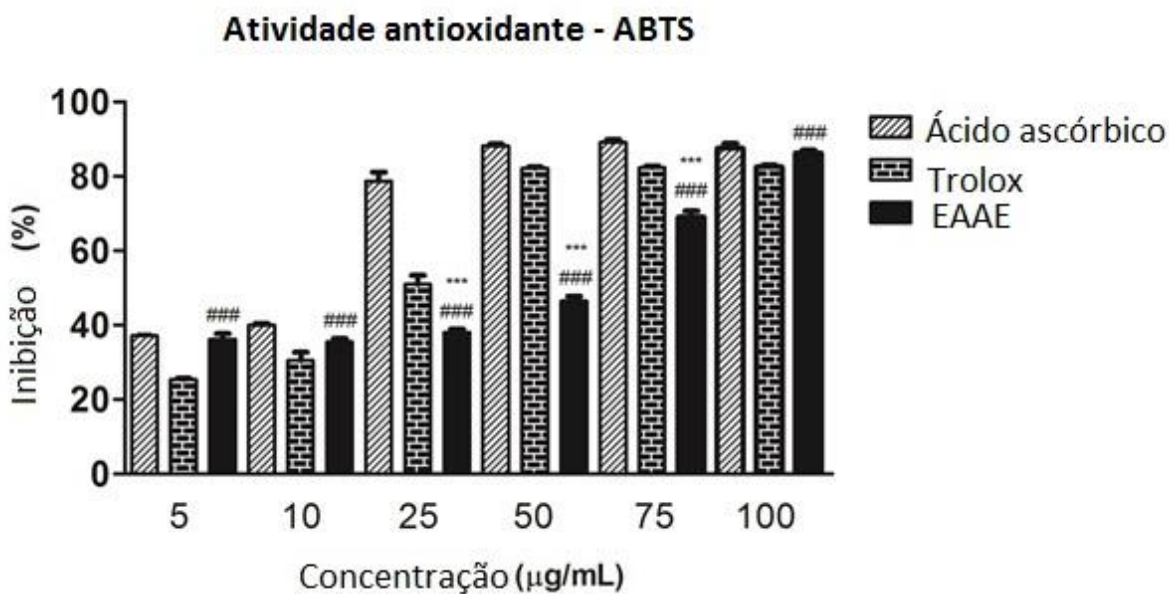


Figura 2. Efeito antioxidante do EAAE diluído em metanol, ácido ascórbico (controle positivo) e Trolox (controle positivo) por ABTS+. Os resultados são apresentados como média \pm D.P. em triplicata. Realizou-se ANOVA unidireccional seguida pelo teste de Tukey ($p \leq 0,001$). *** Ácido ascórbico. ### Trolox.

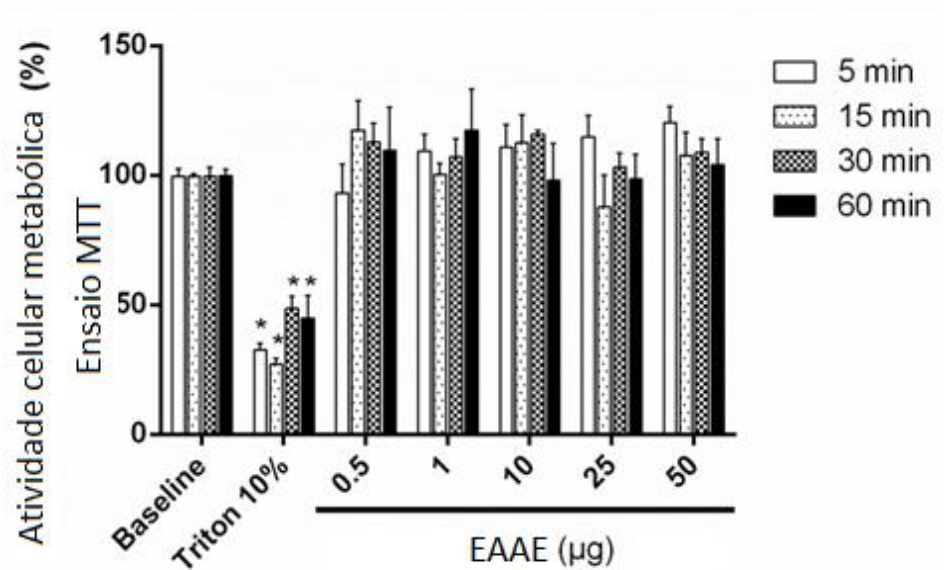


Figura 3. Efeito do EAAE sobre plaquetas humanas. As plaquetas humanas foram tratadas com 0,5, 1, 10, 25 e 50 µg/mL de extrato durante 5, 15, 30 e 60 min. Triton 10% (controlo positivo) e Baseline (plaquetas não tratadas como controlo negativo) foram utilizados como controlo. Os resultados são apresentados como média + D.P.. N = 5; ANOVA bidirecional seguida do teste de Tukey; * P <0,05 em comparação com o grupo basal.

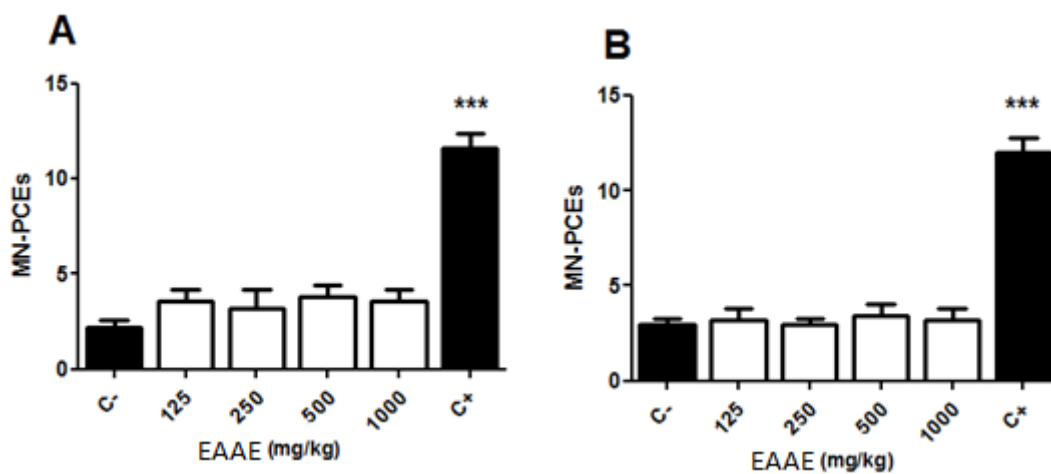


Figura 4. Efeitos do tratamento com o EAAE e ciclofosfamida (C +) nas contagens de eritrócitos policromáticos micronucleados (MN-PCEs) de ratos (A) e ratos (B). Cada barra representa a média de 5 animais e as linhas verticais mostram o D.P. * indica o nível de significância em comparação com o grupo controle (C-). Utilizou-se ANOVA unidirecional seguida do teste de Tukey (***) p ≤ 0,001).

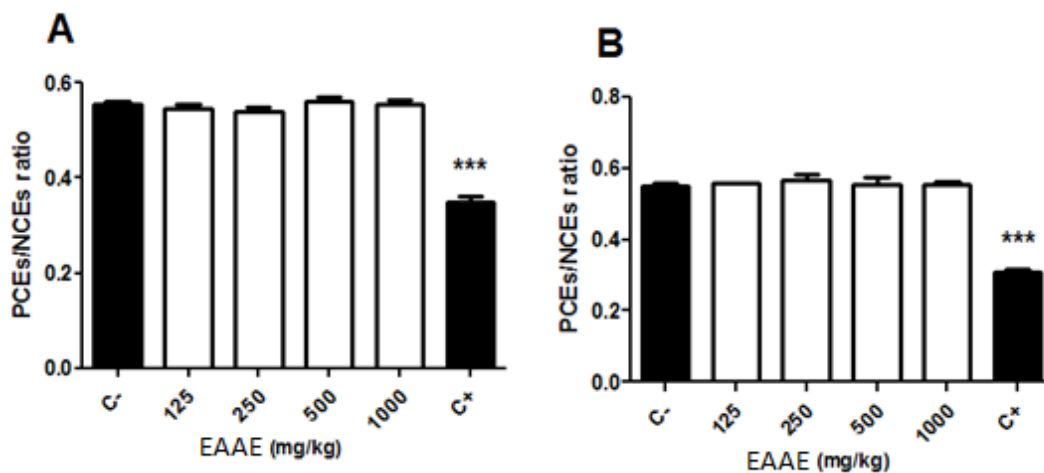


Figura 5. Efeitos do tratamento com o EAAE e ciclofosfamida (C +) sobre os eritrócitos normocromáticos (razão PCEs/NCEs) de ratas (A) e ratos (B). Cada barra representa a média de 5 animais e as linhas verticais mostram o D.P. *indica o nível de significância em comparação com o grupo controle (C-). Utilizou-se ANOVA unidireccional seguida do teste de Tukey (***) $p \leq 0,001$.

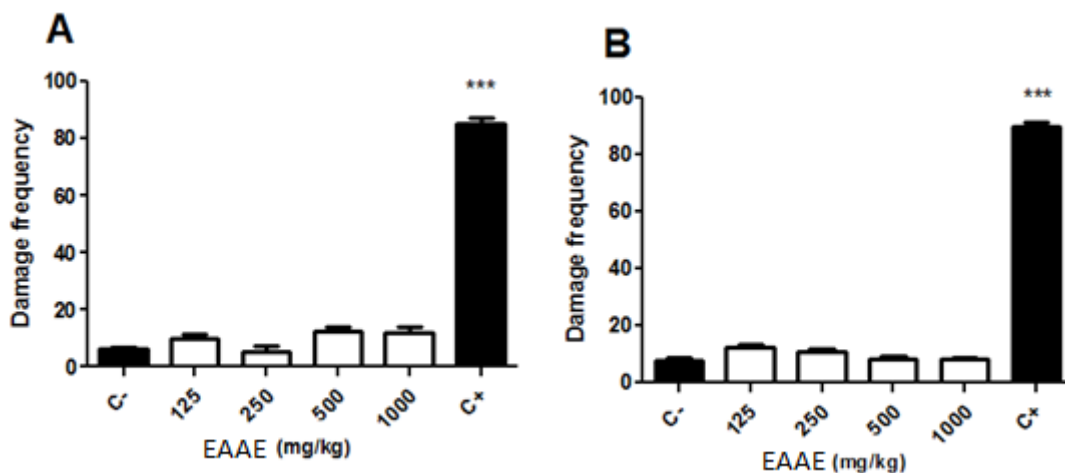


Figura 6. Efeitos do tratamento com o EAAE e ciclofosfamida (C +) na frequência de danos ao DNA de ratas (A) e ratos (B). Cada barra representa a média de 5 animais e as linhas verticais mostram o D.P. *indica o nível de significância em comparação com o grupo controle (C-). Utilizou-se ANOVA unidireccional seguida do teste de Tukey (***) $p \leq 0,001$. Frequência de dano: número de células com danos em 100 células analisadas.

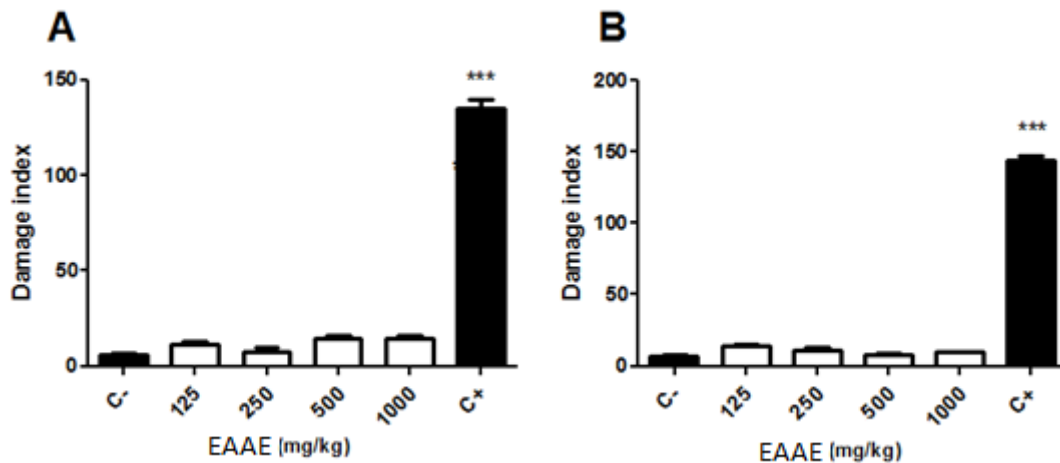


Figura 7. Efeitos do tratamento com o EAAE e ciclofosfamida (C +) sobre o índice de danos ao DNA de ratas (A) e ratos (B). Cada barra representa a média de 5 animais e as linhas verticais mostram o D.P. *indica o nível de significância em comparação com o grupo controle (C-). Utilizou-se ANOVA unidirecional seguida do teste de Tukey (***) $p \leq 0,001$. Índice de dano: tipo de dano x número de células com dano.



Figura 8: Avaliação macroscópica de órgãos vitais (pulmão, coração, rim, fígado, baço) de animais tratados oralmente com o eAAE. (A) Órgãos vitais com aspecto normal de animais tratados com solução salina (grupo controle negativo); (B) Órgãos vitais com aspecto normal de animais tratados oralmente com 1000 mg/kg de EAAE durante quatro semanas. Não foram observadas alterações significativas.

6. CONCLUSÕES GERAIS

- O EAAE possui elevada atividade antioxidante segundo os métodos de DPPH e ABTS.
- A DL50 do EAAE é maior que 2000 mg/kg.
- Todas as doses do EAAE testadas podem ser consideradas seguras em ratos, visto que não causaram nenhuma mortalidade, danos aos órgãos vitais, alterações hemato-bioquímicas ou alterações no comportamento geral após exposição aguda e subcrônica.
- O EAAE não causou genotoxicidade e mutagenicidade em nenhuma das doses testadas nos ensaios de cometa e teste de micronúcleo.

7. ANEXOS

Anexo 1 – Carta de aceite do periódico *Journal of Ethnopharmacology*.

Date: 02/11/2016
To: "Sara Emilia Lima Tolouei Menegati" saratolouei@gmail.com,carlostmenegati@gmail.com
From: "Journal of Ethnopharmacology" jethnoph@chem.leidenuniv.nl
Subject: Your Submission

Ref.: Ms. No. JEP-D-16-01293R2
 Acute and subacute toxicity of the aqueous extract of *Alibertia edulis* (Rich.) A.Rich. ex DC. in rats
 Journal of Ethnopharmacology

Dear Dr. Lima Tolouei Menegati,

I am pleased to tell you that your work has now been accepted for publication in Journal of Ethnopharmacology.

Comments from the Editor and Reviewers can be found below.

Kindly note that no further correction with regard to scientific content can be done now.

Your accepted manuscript will now be transferred to our production department and work will begin on creation of the proof. If we need any additional information to create the proof, we will let you know. If not, you will be contacted again in the next few days with a request to approve the proof and to complete a number of online forms that are required for publication.

When your paper is published on ScienceDirect, you want to make sure it gets the attention it deserves. To help you get your message across, Elsevier has developed a new, free service called AudioSlides: brief, webcast-style presentations that are shown (publicly available) next to your published article. This format gives you the opportunity to explain your research in your own words and attract interest. You will receive an invitation email to create an AudioSlides presentation shortly. For more information and examples, please visit <http://www.elsevier.com/audioslides>.

Thank you for submitting your work to this journal.

With kind regards

Prof.Erdem Yesilada, Ph.D.
 Associate Editor
 Journal of Ethnopharmacology

Comments from the Editors and Reviewers:

Reviewer #1: The authors have improved the quality of the revised manuscript. Although this study still lacks significant, it provides the "spirit" of using agency guidelines, which may have impact on the further studies on this aspect.

Reviewer #2: The authors have responded satisfactorily to the comments of the reviewers and it is acceptable for publication.

For further assistance, please visit our customer support site at <http://help.elsevier.com/app/answers/list/p/7923>. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions and learn more about EES via interactive tutorials. You will also find our 24/7 support contact details should you need any further assistance from one of our customer support representatives.

Anexo 2 - Carta de submissão ao periódico *Mutation Research Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*.

Ref: MUTGEN_2016_307

Title: Evaluation of the antioxidant and genotoxic potential of the aqueous extract of *Alibertia edulis* (Rich.) A. Rich. ex DC.

Journal: Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis

Dear Ms. Lima Tolouei Menegati,

Thank you for resubmitting your manuscript for consideration for publication in Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis. Your resubmission was received in good order.

To track the status of your manuscript, please log into

EVISE® http://www.evise.com/evise/faces/pages/navigation/NavController.jspx?JRNL_ACR=MUTGEN and go to 'My Submissions'.

We appreciate your resubmitting your work to this journal.

Kind regards,

Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis

Have questions or need assistance?

For further assistance, please visit our [Customer Support](#) site. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions, and learn more about EVISE® via interactive tutorials. You can also talk 24/5 to our customer support team by phone and 24/7 by live chat and email.

Copyright © 2016 Elsevier B.V. | [Privacy Policy](#)

Elsevier B.V., Radarweg 29, 1043 NX Amsterdam, The Netherlands, Reg. No. 33156677.

Anexo 3 - Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais



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

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

Dourados-MS, 2 de março de 2016.

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Produtividade, análises químicas e avaliação toxicológica de *Alibertia edulis* (L.C. Rich.) A.C. Rich.", protocolo nº 29/2015, sob responsabilidade de Maria do Carmo Vieira – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFGD) da Universidade Federal da Grande Dourados, em reunião de 29 de janeiro de 2016.

<i>Vigência do Projeto</i>	10/03/2016 – 10/03/2017
<i>Espécie/linhagem</i>	<i>Rattus norvegicus</i> /Wistar
<i>Nº de animais</i>	130
<i>Peso/idade</i>	200-300 g/ 50 dias
<i>Sexo</i>	85 Machos e 45 Fêmeas
<i>Origem</i>	Biotério da Faculdade de Ciências da Saúde-FCS/UFGD

Melissa Negrão Sepulveda

Melissa Negrão Sepulveda
Coordenadora CEUA