

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

**Avaliação da toxicidade aguda, potencial genotóxico, mutagênico e antimutagênico do extrato dos frutos da *Elaeocarpus serratus***

**MI YE MARCAIDA OLIMPIO**

**Dourados – MS**

**2020**

MI YE MARCAIDA OLIMPIO

**Avaliação da toxicidade aguda, potencial genotóxico, mutagênico e antimutagênico do extrato dos frutos da *Elaeocarpus serratus***

Área do CNPQ: Toxicologia de Produtos Naturais

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

Área de concentração: Farmacologia

Orientador: Profa. Dra. Silvia Aparecida Oesterreich

Coorientador: Profa. Dra. Ariany Carvalho dos Santos

Dourados – MS

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

O46a Olimpio, Mi Ye Marcaida

Avaliação da toxicidade aguda, potencial genotóxico, mutagênico e antimutagênico do extrato dos frutos da *Elaeocarpus serratus* [recurso eletrônico] / Mi Ye Marcaida Olimpio. -- 2020.  
Arquivo em formato pdf.

Orientadora: Silvia Aparecida Oesterreich.

Coorientadora: Ariany Carvalho dos Santos.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde)-Universidade Federal da Grande Dourados, 2020.

Disponível no Repositório Institucional da UFGD em:

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

1. Micronúcleo. 2. Ensaio cometa. 3. *Drosophila melanogaster*. 4. Azeitona do Ceilão. I. Oesterreich, Silvia Aparecida. II. Santos, Ariany Carvalho Dos. III. Título.

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

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



# UFGD

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO APRESENTADA POR MI YE MARCAIDA OLIMPIO, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU EM CIÊNCIAS DA SAÚDE, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO "FARMACOLOGIA".

Ao vigésimo dia do mês de fevereiro do ano de 2020, às 09 horas, em sessão pública, realizou-se, no(a) Sala 103 – Bloco C, da Faculdade de Ciências da Saúde – FCS, Universidade Federal da Grande Dourados - UFGD II, a Defesa de Dissertação de Mestrado intitulada "Avaliação da toxicidade aguda, potencial genotóxico, mutagenico e antimutagenico do extrato de *Elaeocarpus serratus*" apresentada pelo(a) mestrando(a) **MI YE MARCAIDA OLIMPIO**, do Programa de Pós-Graduação Mestrado em Ciências da Saúde, à Banca Examinadora constituída pelos(as) professores(as) Dr<sup>a</sup>. Silvia Aparecida Oesterreich (Presidente/orientador(a)), Dr. Nelson Carvalho Farias Junior/UFGD (membro titular), Dr. Ramão Souza Deus Junior/UFGD (membro titular) e Dr. Marcio Eduardo de Barros/UFGD (membro titular). Iniciada sessão, a presidência deu a conhecer ao(à) candidato(a) e aos integrantes da Banca as normas a serem observadas na apresentação da Dissertação. Após o(a) candidato(a) ter apresentado a sua Dissertação, no tempo previsto de 20 até 30 minutos, os componentes da Banca Examinadora fizeram suas arguições, que foram intercaladas pela defesa do(a) candidato(a), no tempo previsto de até 240 minutos. Terminadas as arguições, a Banca Examinadora, em sessão secreta, passou ao julgamento, tendo sido o(a) candidato(a) considerado(a) **APROVADA**, fazendo jus ao título de **MESTRE EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**. Nada mais havendo a tratar, lavrou-se a presente ata, que vai assinada pelos membros da Banca Examinadora.

Dourados, 20 de fevereiro de 2020 .

Dr<sup>a</sup>. Silvia Aparecida Oesterreich \_\_\_\_\_

Dr. Nelson Carvalho Farias Junior \_\_\_\_\_

Dr. Ramão Souza Deus Junior \_\_\_\_\_

Dr. Marcio Eduardo de Barros \_\_\_\_\_

## **DEDICATÓRIA**

Dedico esse trabalho à Deus,  
Aparecido, Doris, Jin Hwa e  
Vittorio Nobuo, minha força  
e esteio nessa jornada.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, pelo dom da vida, pela saúde, sabedoria e amor que me mostrou durante essa trajetória.

Ao casal Sun Myung e Hak Ja Han Moon, por serem um dos meus pilares de fé e que uniram duas culturas através dos meus pais. Seu exemplo de amor e dedicação a Deus me inspiram muito a seguir em frente, especialmente ante às dificuldades.

Aos meus pais, Aparecido e Doris, por todo amor, apoio e incentivo desde o início. Ao meu irmão, Jin Hwa, pelo companheirismo de todas as horas. Mesmo fisicamente distantes um do outro, nosso laço de amor e união vence qualquer distância.

Ao meu esposo, Vittorio Nobuo, por todo seu amor, dedicação, incentivo ante às dificuldades, e por acreditar sempre em nós. Ainda que distante fisicamente, seu amor sempre ressoou em mim e me deu forças para seguir em frente.

Aos meus amigos e amigas, que direta ou indiretamente, me incentivaram e tornaram a trajetória mais leve: Hanmi, Carol, Yhohana, Giselle, Aline, Hansun, Gabriel, Maitê, Sabrina e Adriana. Minha gratidão eterna a vocês!

Aos colegas do Grupo de Pesquisa Biologia Aplicada à Saúde: Flávio, Luis Henrique, Fernanda, Thiago, Daiana, Raquel, Jéssica e Eduardo. Obrigada por toda a parceria e aprendizado. Estar ao lado de vocês foi um privilégio.

À Letícia, Luiz Fernando e todos os alunos de IC que me acompanharam nessa pesquisa, fico muito feliz e agradecida por ter contribuído na formação acadêmica de vocês. Nunca vou esquecê-los, muito obrigada por tudo!

À professora Ariany Carvalho dos Santos, minha coorientadora, pela sua dedicação e carinho na co-orientação. Agradeço muito por tudo que aprendi com você!

À professora Zaira da Rosa Guterres, por toda troca de conhecimentos e aprendizados durante minhas idas à Campo Grande. Agradeço por todo seu carinho, consideração e apoio.

À professora Silvia Aparecida Oesterreich, minha orientadora, que me acompanha desde a graduação, que nunca desistiu de mim e que sempre acreditou no meu potencial. Se hoje sou

alguém na pesquisa, devo a ela, que me inspira pelo seu profissionalismo e amor à ciência.  
Eternamente grata a você, professora!

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Vista geral da <i>Elaeocarpus serratus</i>	4
Figura 2 – Galhos de <i>Elaeocarpus serratus</i> com folhas, flores desabrochadas e frutos	4
Figura 3 – Frutos da <i>E. serratus</i>	5
Figura 4 – Sementes da <i>E. serratus</i>	5
Figura 5 – Formação de eritrócitos policromáticos (PCEs) e eritrócitos normocromáticos (NCEs)	12
Figura 6 – Formação de uma célula micronucleada	13
Figura 7 – Eritrócito micronucleado, eritrócito policromático sem micronúcleo, eritrócito normocromático sem micronúcleo	13
Figura 8 – Esquematização das células submetidas ao ensaio cometa	15
Figura 9 – Escala de dano no ensaio cometa	15
Figura 10 – Mecanismo de ação tóxica da doxorubicina	18
Figura 11 – <i>Drosophila melanogaster</i>	19
Figura 12 – Pelo selvagem e pelos mutantes ( <i>mwh</i> e <i>flr<sup>3</sup></i> )	20
Figura 13 – Ciclo de vida da <i>D. melanogaster</i>	21
Figura 14 – Esquemas genéticos de formação de manchas mutantes com os marcadores <i>mwh</i> e <i>flr<sup>3</sup></i> no teste SMART	23
Figura 15 – Asas de <i>D. melanogaster</i> com aumento de 400x	24
Figura 16 – Superfície da asa de <i>D. melanogaster</i>	24

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Nomenclatura Botânica da <i>E. serratus</i>	3
Tabela 2 – Composição nutricional da polpa de <i>E. serratus</i>	7
Tabela 3 – Fármacos antineoplásicos e seus respectivos mecanismos de ação	16

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
OECD	<i>Organisation for Economic Co-operation and Development</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
DNA	Ácido desoxirribonucleico
RNA	Ácido ribonucleico
PCE	Eritrócito policromático anucleado
pH	Potencial hidrogeniônico
GC-MS	Cromatografia gasosa com espectrômetro de massa
QE	Quercetina equivalente
CE	Catequina equivalente
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
PCE	Eritrócito policromático
NCE	Eritrócito normocromático
TP2	Topoisomerase II
SCGE	<i>Single cell gel electrophoresis</i>
SMART	<i>Somatic Mutation and Recombination Test</i>
mwh	<i>Multiple wing hairs</i>
flr <sup>3</sup>	<i>Flare</i>
ORR	<i>Oregon R flare</i>
DDT	Diclorodifeniltricloroetano

ST                    *Standard cross*

HB                    *High bioactivation cross*

## **Avaliação da toxicidade aguda, potencial genotóxico, mutagênico e antimutagênico do extrato dos frutos da *Elaeocarpus serratus***

### **RESUMO**

O uso de plantas medicinais tem sido incentivado pela Organização Mundial de Saúde (OMS), porém, o conhecimento popular não é suficiente para validar a segurança de consumo de uma planta. Os estudos de toxicidade e genotoxicidade são necessários para avaliar os possíveis efeitos adversos, garantindo a segurança para o uso da planta medicinal. A *Elaeocarpus serratus* (azeitona do Ceilão), é uma espécie comum oriunda da Índia, e seus frutos possuem grande quantidade de minerais, fibras e compostos bioativos com diversas aplicabilidades. Apesar das propriedades do fruto, não existem registros no Brasil de estudos que validem seu uso seguro. O objetivo da pesquisa foi avaliar a toxicidade aguda, potencial genotóxico, mutagênico e antimutagênico do extrato dos frutos de *Elaeocarpus serratus*. Para o teste de toxicidade aguda, dez ratas *Wistar* (n= 5) foram tratadas via oral com dose única de 2000 mg/kg de peso do extrato aquoso, sendo observadas e avaliadas de acordo com o screening hipocrático durante 14 dias. No 15º dia os animais foram submetidos à eutanásia e realizada coleta dos órgãos vitais para análise macroscópica. Para os ensaios de genotoxicidade, onde 60 ratos de ambos os sexos (n= 10; cinco de cada sexo) foram tratados com as doses de 125, 250, 500 e 1000 mg/kg do extrato. O potencial genotóxico foi avaliado de acordo com o teste de micronúcleo e o ensaio de cometa. Para os ensaios de mutagenicidade e antimutagenicidade foi aplicado o teste de detecção de mutação e recombinação somática (SMART) nas asas de *Drosophila melanogaster*, utilizando os cruzamentos padrão (ST) e alta bioativação (HB) e o extrato foi avaliado nas doses de 1,25, 2,5 e 5 mg/mL. As mesmas doses foram associadas à doxorrubicina (0,125 mg/mL) para o ensaio de antimutagenicidade. Análise estatística feita através dos testes ANOVA, Tukey com  $p < 0,05$  e Frei e Wrügler para o ensaio SMART. O extrato dos frutos da *Elaeocarpus serratus* não é tóxico na dose de 2000 mg/kg e não apresenta efeitos genotóxicos e mostra potencial antimutagênico quando associado à doxorrubicina.

**Palavras-chave:** Micronúcleo, ensaio cometa, *Drosophila melanogaster*, azeitona do Ceilão.

## **Evaluation of acute toxicity, genotoxic, mutagenic and antimutagenic potential of *Elaeocarpus serratus* fruit extract**

### ***ABSTRACT***

The use of medicinal plants has been encouraged by the World Health Organization (WHO), but popular knowledge is not sufficient to validate the safety of consumption of a plant. Toxicity and genotoxicity studies are necessary to evaluate possible adverse effects, ensuring safety for the use of the medicinal plant. *Elaeocarpus serratus* (Ceylon olive), is a common species from India, and its fruits have large quantities of minerals, fibers and bioactive compounds with various applications. Despite the properties of the fruit, there are no records in Brazil of studies validating its safe use. The aim of the research was to evaluate the acute toxicity, genotoxic, mutagenic and antimutagenic potential of the extract of *Elaeocarpus serratus* fruits. For the acute toxicity test, ten Wistar rats (n=5) were treated orally with a single dose of 2000mg/kg weight of the aqueous extract, being observed and evaluated according to hypocratic screening for 14 days. On the 15th day the animals were submitted to euthanasia and vital organs were collected for macroscopic analysis. For the genotoxicity tests 60 rats of both sexes (n=10; five of each sex) were treated with doses of 125, 250, 500 and 1000mg/kg of the extract. The genotoxic potential was evaluated according to the micronucleus test and the comet assay. For the mutagenicity and antimutagenicity assays, the somatic mutation and recombination detection test (SMART) was applied on *Drosophila melanogaster* wings, using standard crossings (ST) and high bioactivation (HB) and the extract was evaluated at doses of 1.25, 2.5 and 5mg/mL. The same doses were associated with doxorubicin (0.125mg/mL) for the antimutagenicity test. Statistical analysis was performed using ANOVA, Tukey with  $p < 0.05$  and Frei and Wrügler for the SMART test. *Elaeocarpus serratus* fruit extract is non-toxic at 2000mg/kg dose and does not present genotoxic effects and shows antimutagenic potential when associated with doxorubicin.

**Keywords:** Micronucleus, comet assay, *Drosophila melanogaster*, Ceylon olive.

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1. Plantas Medicinais	2
2.2. Gênero <i>Elaeocarpus</i>	2
2.2.1. Espécie <i>Elaeocarpus serratus</i>	2
2.2.2. Características Taxonômicas e Botânicas	3
2.2.3. Nome popular e distribuição geográfica	6
2.2.4. Usos da espécie	6
2.2.5. Composição nutricional	6
2.2.6. Composição química	7
2.3. Compostos antioxidantes	7
2.4. Estudos Pré-Clínicos	9
2.4.1. Estudos de Toxicidade	9
2.4.1.1. Toxicidade Aguda	9
2.4.2. Estudos genotóxicos	10
2.4.2.1. Modelos para estudos genotóxicos	11
2.4.2.2. Teste do micronúcleo	11
2.4.2.3. Ensaio cometa <i>SCGE</i>	14
2.4.3. Mutagênese	16
2.4.4. Doxorrubicina	17
2.4.5. Antimutagênese	18
2.4.6. Teste SMART ( <i>Somatic Mutation and Recombination Test</i> )	19
3 OBJETIVOS	25
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	26
5 APÊNDICES	34
5.1. Artigo 1 Avaliação do potencial genotóxico, mutagênico e antimutagênico do extrato de <i>Elaeocarpus serratus</i>	35
6 CONCLUSÕES	61
7 ANEXOS	62
7.1. Aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA)	63

## 1 INTRODUÇÃO

Desde os tempos mais remotos até os dias atuais, o emprego de plantas medicinais representa por vezes o único recurso terapêutico de diversos grupos étnicos e comunidades, já que sumariza conhecimentos, práticas e habilidades no diagnóstico, tratamento e prevenção de doenças, preservando a singularidade cultural de cada povo (MACIEL et al., 2002; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2000).

O uso de plantas medicinais ainda prevalece principalmente nos países em desenvolvimento, o que impulsiona a investigação de suas características e propriedades terapêuticas para a confecção e aprimoramento de fitoterápicos, que podem ser apresentados em forma de xaropes e extratos (SILVEIRA, BANDEIRA, ARRAIS, 2008).

Extratos provenientes de plantas medicinais vêm sendo utilizados como medicamentos fitoterápicos em substituição aos medicamentos alopáticos, devido à sua gama de aplicabilidades terapêuticas e fácil acesso pela população. Desta forma, tornando-se relevante o estudo da composição destas, seus efeitos farmacológicos e possíveis efeitos tóxicos (AL-OKBI, 2014; KLEIN, 2009).

A *Elaeocarpus serratus*, conhecida como azeitona do Ceilão, é uma árvore de médio porte, folhas simples e frutos considerados drupas, amplamente distribuída desde a África Oriental até o Brasil (PEIRIS, 2007). Na medicina popular, a decocção da casca é utilizada na cura de hemorragias, as folhas são usadas no tratamento de reumatismo (PULLAIAH, 2006). Os frutos são usados popularmente para o tratamento de diarreias e disenteria e o suco dos frutos são oferecidos à pacientes hospitalizados para aumento de apetite, ao permitir a secreção das papilas gustativas (GEETHA, JAYASHREE, RAJESWARI, 2015). Os frutos possuem compostos bioativos com propriedades antioxidantes e o extrato etanólico dos frutos demonstrou atividade antimicrobiana e antidiabética (MACHAMMA, 2015).

Apesar das propriedades que os frutos de *Elaeocarpus serratus* apresentam, no Brasil carecem estudos a respeito do fruto, tanto de toxicologia clínica quanto de genética toxicológica, que possam validar o uso seguro deste. O objetivo da pesquisa foi avaliar a toxicidade aguda, potencial genotóxico, mutagênico e antimutagênico do extrato aquoso dos frutos de *Elaeocarpus serratus*.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Plantas Medicinais

Segundo Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (2016), planta medicinal é qualquer espécie de origem vegetal, seja esta cultivada ou não, que é utilizada para fins terapêuticos, de onde podem surgir drogas vegetais, mais conhecidas como fitoterápicos (BRASIL, 2016).

Os fitoterápicos podem ser definidos como sendo medicamentos que são obtidos exclusivamente de matérias-primas ativas vegetais, a partir do conhecimento da eficácia e riscos de sua utilização, qualidade e reprodutibilidade destes que são confirmados por meio de estudos etnofarmacológicos, ensaios clínicos ou estudos tecnocientíficos (CARNEIRO et al., 2014).

Para a confecção dos fitoterápicos, existem fatores a serem estudados e considerados na seleção da planta, que são: escolha da planta, escolha embasada nas informações provenientes da população e o uso desta, além de estudos farmacológicos e de toxicidade a partir da planta em pó, em tinturas, em óleos ou extratos (BRASIL, 2013).

### 2.2. Gênero *Elaeocarpus*

O gênero *Elaeocarpus* pertence à família *Elaeocarpaceae*, que abrange 10 gêneros e 400 espécies de árvores tropicais, onde o gênero *Elaeocarpus* deriva da palavra grega “*elaia*” que significa oliva e “*karpos*” que significa fruto (PEIRIS, 2007; MEIJER, 1995). A identificação das espécies de *Elaeocarpus* foi realizada por vários pesquisadores por Ramamoorthy (1976), Saldanha (1984), Murti (1993) e Meijer (1995) (ZMARZTY, 2001).

Em algumas espécies do gênero *Elaeocarpus*, identificou-se a presença de alcaloides, flavonoides, taninos e ácidos graxos, além de apresentarem potencial antiasmático, antidepressivo, anti-inflamatório (*Elaeocarpus sphaericus*), ansiolítico (*Elaeocarpus ganitrus*), antidiabético (*Elaeocarpus ganitrus* e *Elaeocarpus grandiflorus*), anti-hipertensivo (*Elaeocarpus ganitrus* Roxb.), antimicrobiana e antirreumática (*Elaeocarpus serratus*) (DADICH et al., 2013).

#### 2.2.1. Espécie *Elaeocarpus serratus*

A *Elaeocarpus serratus* L. foi descrita pela primeira vez em 1753 por Linnaeus, e que de acordo com a última revisão a respeito do gênero, uma nova variedade de *Elaeocarpus serratus* foi identificada, a *Elaeocarpus serratus* L. var. *weibelii* Zmarzty (ZMARZTY, 2001).

### 2.2.2. Características Taxonômicas e Botânicas

Em relação às suas características taxonômicas, a *Elaeocarpus serratus* pode ser definida da seguinte forma:

Tabela 1 – Nomenclatura Botânica da *E. serratus*

Reino	Plantae
Divisão	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Subclasse	Dillenidae
Ordem	Malvales
Família	Elaeocarpaceae
Subfamília	Elaeocarpaoideae
Tribo	Elaeocarpaceae
Subtribo	Elaeocarpinae
Gênero	Elaeocarpus
Espécie	Elaeocarpus serratus L.

(Adaptado de PEIRIS, 2007)

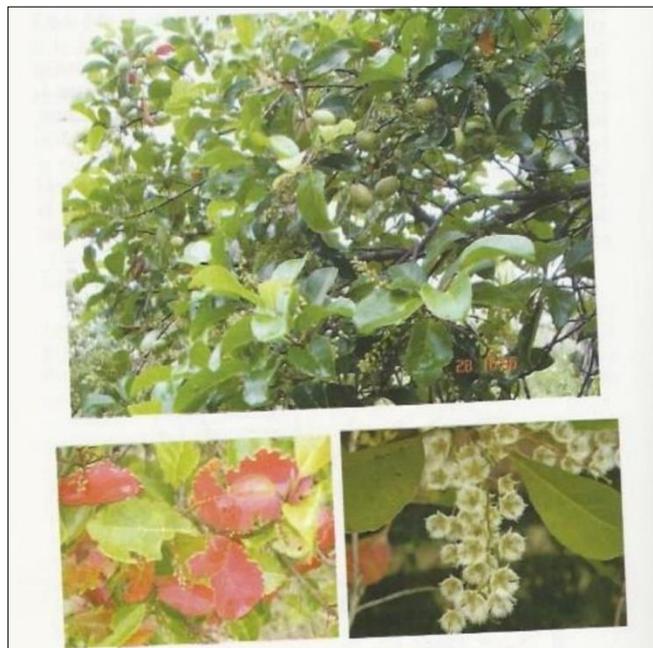
A *Elaeocarpus serratus* L. caracteriza-se como uma árvore de médio a grande porte, chegando a medir 10 a 20 metros de altura, com um tronco com 30 centímetros de diâmetro (Figura 1). As folhas medem de 5 a 10 centímetros de comprimento, com um formato largamente elíptico ou oblíquo, de coloração verde-oliva que pode se tornar vermelha antes da senescência. As flores são brancas e pequenas, agrupadas em axilares (Figura 2) (PEIRIS, 2007; ZMARZTY, 2001). Os frutos são comestíveis, de formato elipsoide ou ovoide, medindo entre 2,1 a 3,9 centímetros, com base cuneada à redonda, apresentando casca de cor esverdeada em drupas oblongas, mesocarpo (polpa) seco com 0,5 a 5 milímetros de espessura de cor verde-claro verde-escuro, apresentando logo após o mesocarpo uma semente seca (Figura 3) (Figura 4) (ZMARZTY, 2001).

Figura 1 – Vista geral da *Elaeocarpus serratus*.



(Fonte: Arquivo pessoal, 2019)

Figura 2 – Ramos de *Elaeocarpus serratus* com folhas, flores e frutos e flores desabrochadas.



(Fonte: PEIRIS, 2007)

Figura 3 – Frutos da *E. serratus*.



(Fonte: Arquivo pessoal, 2019)

Figura 4 – Semente de *E. serratus*.



(Fonte: Arquivo pessoal, 2019)

### **2.2.3. Nome popular e distribuição geográfica**

O fruto da *Elaeocarpus serratus* é popularmente conhecido no Sri Lanka como “veralu”, na Índia como “rudraksh”, “chiribilva”, “jalpai”, “ulangkarei”, “perinkara”, “avil”, “valiyakara” e “jolopari”, e no Brasil é conhecida como “Azeitona do Ceilão” (BARUAH et al., 2019; DE, PARIKH, 1985).

É encontrada por quase todo território de florestas da Índia. No Sri Lanka, pode ser encontrada em florestas de baixa altitude nas zonas intermediárias úmidas, e é cultivada de forma ornamental ou como planta medicinal na Austrália, China, Gana, Indonésia, Malásia, Bangladesh, Taiwan, Tailândia e Brasil (PEIRIS, 2007; MOHANAN, SABU, 2002). Apesar de ser conhecida no Brasil, ainda não há estudos que descrevam com clareza a introdução e distribuição da espécie no território nacional (DE LIMA et al., 2019).

### **2.2.4. Usos da espécie**

Os frutos da *E. serratus*, quando maduros são macios, de sabor adocicado a levemente azedo. No comércio popular, os frutos são vendidos como petiscos, e algumas empresas estão fabricando conservas de *E. serratus* em substituição à tradicional azeitona (PEIRIS, 2007).

De acordo com Ghani (1998) e Peiris (2007), na medicina popular a *E. serratus* é manipulada como diurético e estimulante cardiovascular. A decocção da casca é dada para a cura de hemorragias, biliosidade e úlceras, suas folhas são usadas no tratamento do reumatismo e como antídoto para envenenamentos (DADICH et al. 2013 apud PULLAIAH, 2006). Os frutos geralmente são empregados no tratamento da disenteria e diarreia, sendo ofertado à pacientes para estimular a secreção das papilas gustativas, consequentemente aumentando o apetite destes (GEETHA, JAYASHREE, RAJESWARI, 2015).

### **2.2.5. Composição nutricional**

Peiris (2007) demonstrou, com base em estudos anteriores, a composição nutricional da polpa dos frutos da *E. serratus*, que apresentou quantidades consideráveis de proteínas, ferro e vitamina C.

Tabela 2 – Composição nutricional da polpa de *E. serratus*

Constituinte	Quantidade (a cada 100g)
Água (g)	63
Energia (kcal)	140
Proteínas (g)	1,4
Carboidratos (g)	19-35
Cálcio (mg)	11
Fósforo (mg)	21
Ferro (mg)	2,1
Vitamina C (mg)	252

(Fonte: PEIRIS, 2007)

Estudos mais recentes, a exemplo de Lima e colaboradores (2019), apresentou na polpa do fruto de *E. serratus* um baixo pH (2,84), alto valor de atividade de água (0,98  $a_w$ ), baixo teor de lipídeos (1,10 g a cada 100 g) quando comparada com outros frutos similares, e alto teor de fibras (17,50 g a cada 100 g), indicando que o fruto é uma ótima fonte de fibras, suprimindo cerca de 70% das necessidades de fibras de um adulto saudável.

### 2.2.6. Composição Química

Estudos com as folhas da *E. serratus* evidenciaram a presença de esteroides, alcaloides, taninos, flavonoides, saponinas e carboidratos (BISWAS et al., 2012; SHARKER, SHAHID, 2010). Pela técnica de cromatografia gasosa com espectrômetro de massa (GC-MS), os seguintes compostos foram identificados nas folhas da *E. serratus*: ésteres lipídicos, álcoois, hidrocarbonos, aldeídos, alcenos, ácidos graxos e amido (GEETHA, JAYASHREE, RAJESWARI, 2013).

Os principais achados a respeito da composição química da polpa do fruto da *E. serratus* relatam a presença de hidrocarbonos alifáticos saturados, álcoois saturados, taninos, alcaloides, saponinas, flavonoides, carotenoides, ácido ascórbico (vitamina C), triterpenos ( $\alpha$ -amirina,  $\beta$ -amirina, acetato  $\beta$ -mirina), quercetina e campferol, caracterizando-a como uma importante fonte de compostos antioxidantes (LIMA et al., 2019; GEETHA, JAYASHREE, RAJESWARI, 2016; GEETHA, JAYASHREE, RAJESWARI, 2015).

### 2.3. Compostos Antioxidantes

Para manter a homeostase o organismo necessita realizar processos oxidativos para que as células sobrevivam, gerando espécies reativas de oxigênio, que podem ser radicais livres oxigenados ou nitrogenados. Os radicais livres estão presentes em processos regulatórios do metabolismo aeróbico, mas, quando em excesso afetam as principais biomoléculas da célula ao oxidar lipídios de membrana, proteínas celulares, carboidratos, enzimas e até o próprio DNA (PISOSCHI et al., 2016).

Dentre os mecanismos celulares contra os radicais livres destacam-se os antioxidantes naturais, que podem ser exógenos ou endógenos. Os exógenos provem da dieta, que consistem em: carotenoides, tocoferóis, flavonoides, ácido ascórbico (vitamina C) e taninos (PISOSCHI et al., 2016).

A função antioxidante dos flavonoides se dá pela combinação de suas propriedades quelantes e sequestradoras de radicais livres, interferindo na geração e na formação do radical livre em si (TRUERA, SÁNCHEZ, 2001). O campferol, pertencente à classe de flavonoides, diminui a produção de radicais livres no organismo, mas por possuir baixa biodisponibilidade, necessita ligar-se à quercetina para aumentar sua eficácia (IMRAN et al., 2019). A quercetina, também pertencente à classe dos flavonoides, influi na inibição da peroxidação lipídica ao induzir apoptose em pré-adipócitos ao diminuir o potencial de membrana das mitocôndrias (HUANG et al., 2017; PARK, KIM, 2011).

Os carotenoides, precursores da vitamina A, são antioxidantes lipofílicos que neutralizam o solvente causador dos danos oxidativos ao estado não-excitado, permitindo a maior eliminação de radicais livres (HE et al., 2017). A vitamina C é um antioxidante hidrossolúvel que podem reativar a vitamina E (tocoferol) de sua forma oxidada, permitindo inibir indiretamente a peroxidação lipídica (LYKKESFELDT, MICHELS, FREI, 2014).

Lima et al. (2019) avaliaram os compostos bioativos presentes na polpa da *E. serratus* por espectrofotometria. Quanto ao teor de flavonoides, foi encontrado o valor de 120,49mg de QE/100g. Quanto aos taninos, o valor encontrado foi expressivo (16142,40mg de CE/100g), o teor de carotenoides encontrado foi 4,97mg/100g e de vitamina C o valor identificado foi de 5,93mg/100g. Os valores encontrados de quercetina e campferol foram, respectivamente, 12,9mg/g e 13,4g/g.

## **2.4. Estudos Pré-clínicos**

### **2.4.1. Estudos de Toxicidade**

Estudos de toxicidade são feitos no intuito de avaliar as doses seguras do uso de determinada planta medicinal, visando garantir o consumo criterioso nas suas diversas formas de apresentação (WHO, 2000).

A regulamentação a respeito dos fitoterápicos no Brasil vem sendo discutida desde 1995, com a publicação da Portaria nº 6 da ANVISA que estabelecia prazos para as indústrias farmacêuticas apresentarem dados de eficácia e segurança dos medicamentos fitoterápicos. Após a portaria de 1995, a RDC nº 48 publicada em 16 de março de 2004 dispõe acerca do registro dos medicamentos fitoterápicos, e finalmente em 2013 a ANVISA publicou o guia para a realização de teste pré-clínicos para o desenvolvimento de medicamentos (BRASIL, 2018; 2013).

Atualmente, todos os protocolos de análise toxicológica seguem as diretrizes da *Organisation for Economic Co-operation and Development* (OECD, 2008), sendo aplicados no Brasil em conjunto com o Guia para a Condução de Estudos Não Clínicos de Toxicologia e Segurança Farmacológica Necessários ao Desenvolvimento de Medicamentos (BRASIL, 2013), que detalha os protocolos mais utilizados na literatura, que são os de toxicidade aguda, subaguda e os estudos de genotoxicidade.

#### **2.4.1.1. Toxicidade Aguda**

A toxicidade aguda é um teste da área de toxicologia clínica que foi introduzido na década de 1920 por Trevan, com o propósito de avaliar substâncias destinadas ao consumo humano, como a insulina. Com o passar dos anos, esse teste foi sendo cada vez mais utilizado na comparação e classificação da toxicidade de substâncias, sendo adotado como pré-requisito por agências regulatórias tais como a *Food and Drug Administration* (FDA) e a OECD (VALADARES, 2006).

A toxicidade aguda é atualmente regulamentada pela diretriz 425 da OECD, a qual averigua a toxicidade de determinada substância através da administração única ou de múltiplas doses durante um período que não ultrapasse 24h, acompanhado de observações diárias durante 14 dias após a administração, no intuito de definir a dose letal oral mediana (DL50), a qual é

expressa em miligramas por quilograma (mg/kg) de peso corporal e que representa estatisticamente a única dose derivada de uma substância que pode levar a óbito 50% dos animais que receberam a substância por via oral (OECD, 2008).

A dose limite adotada é 2000mg/kg ou 5000mg/kg, sendo administrada em grupos de 5 animais com idade entre 8 a 12 semanas, geralmente ratas fêmeas nulíparas e não-prenhas, já que estas são relativamente mais sensíveis do que os machos (OECD, 2008).

Antes da administração os animais deverão estar em jejum, em seguida pesados e assim a substância poderá ser administrada de acordo com o peso de cada animal, por meio de gavagem com um tubo estomacal ou uma cânula de intubação adequada. Após a administração, os animais deverão ser observados nos primeiros trinta minutos, com especial atenção às quatro horas seguintes, e depois durante uma vez ao dia, no mínimo, até o fim dos 14 dias de estudo, atentando-se a alterações na pelagem, pele, membranas mucosas, olhos, além dos sistemas circulatório, respiratório, sistema nervoso central e autônomo, atividade somatomotora e comportamental, observando sinais como tremores, convulsões, salivação, diarreia, letargia, sonolência e coma (OECD, 2008).

Os parâmetros e alterações descritos anteriormente fazem parte de uma avaliação observacional quantitativa e semiquantitativa de cunho farmacológico e toxicológico de determinada substância, desenvolvida por Malone e Robichaud (1962), denominada screening hipocrático, que permite detectar a presença ou ausência de sintomas sistêmicos em animais tratados durante o teste de toxicidade aguda (MALONE, ROBICHAUD, 1962).

Os animais que vierem à óbito durante o período de estudo devido à exposição à substância alvo, assim como os animais sobreviventes deverão ser submetidos a uma criteriosa biópsia, e caso seja confirmada alguma alteração macroscópica no (s) órgão (s), uma análise histopatológica deverá ser realizada e reportada como uma informação relevante ao estudo (OECD, 2008).

#### **2.4.2. Estudos genotóxicos**

De acordo com Vogel (1989) e Fonseca e Pereira (2004), os estudos genotóxicos derivam da área de Genética Toxicológica e objetivam a detecção da ação de determinadas

substâncias “genotóxicas” para os ácidos nucleicos, em especial o DNA (FONSECA, PEREIRA, 2004; VOGEL, 1989).

O termo genotóxico foi introduzido em 1973 por Hermann Druckley, que significa efeitos tóxicos, letais e hereditários no material genético das células, sejam elas somáticas ou germinativas (KNAAPEN et al., 2006).

Qualquer alteração no DNA ou RNA que afete o gene de forma quantitativa ou qualitativa é considerada uma mutação, que pode acarretar desordens genéticas, fertilidade reduzida e malformações fetais, caso o efeito genotóxico tenha atingido as células germinativas. Se as células somáticas são afetadas, a formação de tumores benignos ou malignos, morte celular e envelhecimento precoce são consequências mais presentes em tal condição (DÜSMAN et al., 2012; FONSECA, PEREIRA, 2004).

Como as mutações são comumente associados ao desenvolvimento de cânceres e defeitos de nascença, conhecer o potencial genotóxico de um agente, seja ele industrializado ou natural, torna-se essencial para as agências reguladoras estabelecerem limites de risco para o homem (RIBEIRO, SALVADORI, MARQUES, 2003).

#### **2.4.2.1. Modelos para estudos genotóxicos**

A realização de estudos genotóxicos em humanos quase sempre resultam no aparecimento de tumores quando em longa exposição, por isso são realizados estudos *in vivo* ou *in vitro*, como em cultura de células, bactérias, roedores e *Drosophila melanogaster* (SALES et al., 2018; BRASIL, 2013; FONSECA, PEREIRA, 2004).

#### **2.4.2.2. Teste do Micronúcleo**

O teste do micronúcleo é um ensaio citogenético descrito pela primeira vez em 1975 por Schimidt W., que investiga células do sangue periférico ou da medula óssea de roedores no intuito de detectar agentes clastogênicos (capazes de realizar a quebra de cromossomos) ou agentes aneugênicos (que induzem a segregação cromossômica anormal), indicando danos genotóxicos (OECD, 2016a; FLORES, YAMAGUCHI, 2008; RIBEIRO, SALVADORI, MARQUES, 2003).

Como matéria-prima para o teste, a medula óssea de qualquer mamífero pode ser utilizada, porém as mais indicadas pelos órgãos regulatórios são o sangue periférico de camundongos, como proposto por Hayashi et al. (1990), e a medula óssea de ratos e camundongos (OECD, 1997).

No indivíduo adulto, os eritrócitos originam-se principalmente na medula óssea (PALMA-CONTAR et al., 2000). Durante o processo de maturação dos eritrócitos oriundos da medula óssea o núcleo é expelido, gerando o eritrócito policromático que ainda é considerado imaturo, que detém de uma coloração violeta devido à mistura de corantes ácidos e básicos, e não é levado para a corrente sanguínea. Após 24h, o eritrócito está maduro e denomina-se eritrócito normocromático, que detém de uma coloração alaranjada devido à interação com corantes ácidos, onde está pronto para circular na corrente sanguínea do indivíduo (Figura 5) (DE SOUZA, 2015; PALMA-CONTAR et al., 2000).

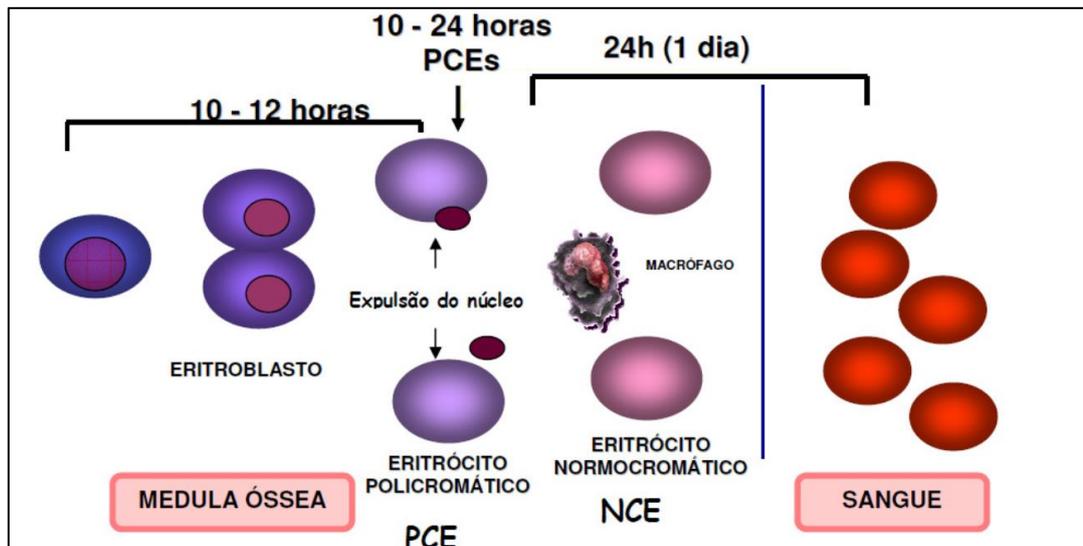


Figura 5 – Formação de eritrócitos policromáticos (PCEs) e eritrócitos normocromáticos (NCEs) (Fonte: DE SOUZA, 2015).

O termo micronúcleo foi introduzido por Bollet e colaboradores na década de 1970, o qual designa corpos cromáticos com diâmetro menor que 1/3 do diâmetro do núcleo celular (DECODIER, KIRSCH-VOLDERS, 2006). No processo de maturação celular, especificamente na telófase, o eritrócito policromático tem seu núcleo extrudado e os micronúcleos que foram formados podem permanecer no citoplasma anucleado, sendo compostos por uma porção de cromatina contendo fragmentos de cromossomos ou

cromossomos inteiros. (Figura 6). Os micronúcleos distinguem-se pela presença ou ausência de cinetócoro ou DNA centromérico, e a frequência de eritrócitos micronucleados imaturos é o principal indício de dano (Figura 7) (OECD, 2016a; FLORES, YAMAGUCHI, 2008).

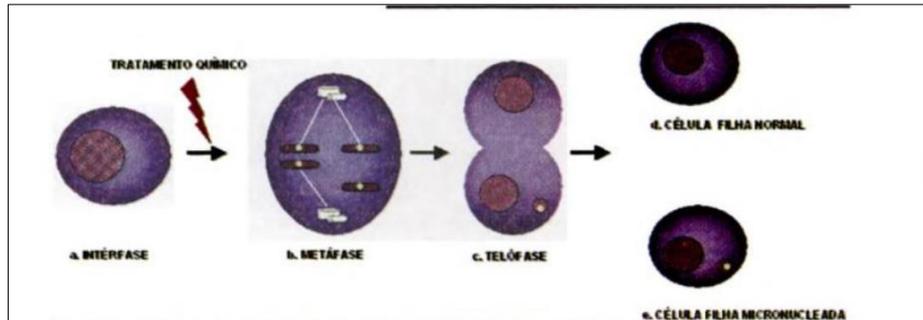


Figura 6 – Formação de uma célula micronucleada. (Fonte: RIBEIRO, SALVADORI, MARQUES, 2003).

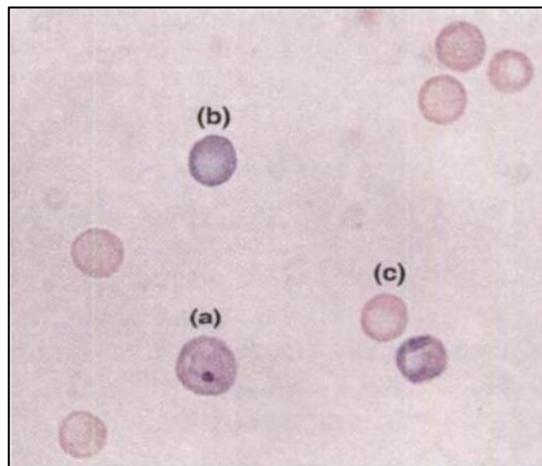


Figura 7 – Eritrócito micronucleado (a), eritrócito policromático sem núcleo (b) e eritrócito normocromáticos sem micronúcleo (c). (Fonte: RIBEIRO, SALVADORI, MARQUES, 2003).

O teste pode ser caracterizado da seguinte forma: (1) a observação dos danos nos eritrócitos policromáticos anucleados (PCEs) causado pelo agente químico; (2) devido ao curto período de vida do eritrócito policromático, qualquer micronúcleo presente é resultante de danos cromossômicos recentes; (3) os micronúcleos são de fácil identificação e com

distribuição definida; (4) a presença de micronúcleos depende do tempo de amostragem (RIBEIRO, SALVADORI, MARQUES, 2003).

Os animais, sejam ratos ou camundongos, devem ser divididos entre grupo controle e grupo tratado, de acordo com o sexo, com o mínimo de 5 animais por grupo, recebendo tanto a substância teste quanto a substância controle pela via similar ao consumo humano. A coleta do material deve ser feita com no mínimo doze horas e no máximo 30 horas após o tratamento, onde a coleta da medula óssea presente no fêmur deve ser realizada logo após a eutanásia. Após centrifugação do material e descarte do sobrenadante, realiza-se a confecção e coloração do material (OECD, 2016a; BRASIL, 2013; FLORES, YAMAGUCHI, 2008).

Na análise dos resultados leva-se em consideração a proporção do total de eritrócitos em cada amostra, sendo de no mínimo 500 eritrócitos para medula óssea e 2000 eritrócitos por sangue periférico. Para quantificar a incidência de eritrócitos micronucleados, pelo menos 4000 células devem analisadas. Quando analisadas por microscopia, a proporção de eritrócitos imaturos não pode ultrapassar em 20% a quantidade de eritrócitos totais, onde resultados positivos indicam dano genotóxico cromossômico estrutural e/ou numérico (OECD, 2016a; RIBEIRO, SALVADORI, MARQUES, 2003).

#### **2.4.2.3. Ensaio cometa *SCGE***

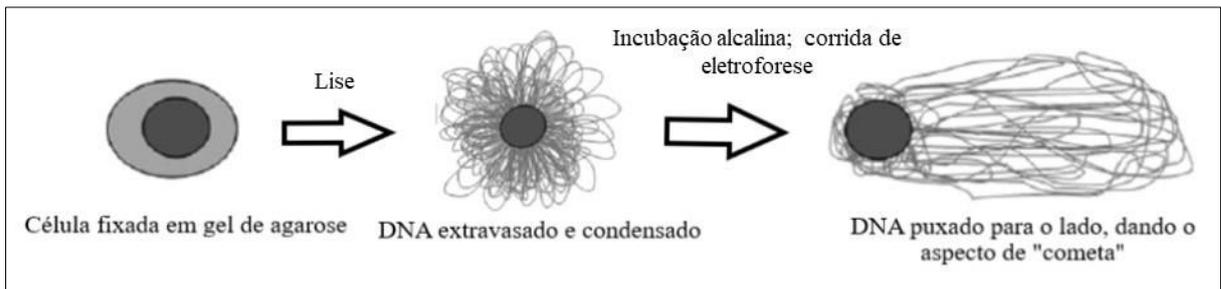
O ensaio cometa *SCGE in vivo* (*single cell gel electrophoresis*) é um teste de baixo custo, versátil e confiável da área de genética toxicológica desenvolvido por Singh et al. (1988), que tem por objetivo identificar substâncias que possam causar danos ao DNA em células expostas à uma determinada substância (MØLLER, 2018; OECD, 2016b).

É utilizado para detectar lesões genômicas que são provocadas por agentes genotóxicos, além de fornecer informações acerca do mecanismo de reparo do DNA, cinética e os tipos de lesão que podem reparadas. Pode ser realizado tanto *in vivo* a partir de qualquer órgão ou tecido, quanto *in vitro* por cultura de células (RIBEIRO, SALVADORI, MARQUES, 2003).

No meio intracelular o DNA permanece enovelado dentro da matriz celular por proteínas histônicas. Quando as células são fixadas em lâminas com gel de agarose, sofrem ação da solução de lise celular, causando o extravasamento do DNA do meio intracelular, que permanece retido em um espaço residual semelhante ao núcleo celular, denominado nucleoide,

e sob meio alcalino ( $\text{pH} \geq 13$ ) são submetidas à corrida de eletroforese, recebendo estímulos elétricos que permitem com que fragmentos do DNA lesionado se dirijam para fora do núcleo celular, dando um aspecto de cometa (Figura 8) (MEZZALIRA, FUNCHAL, DANI, 2014; RIBEIRO, SALVADORI, MARQUES, 2003; COOK, BRAZEL, 1976).

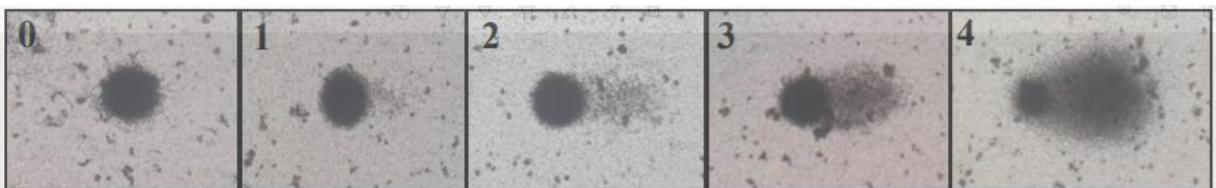
Figura 8 – Esquematização das células submetidas ao ensaio cometa.



(Adaptado de MEZZALIRA, FUNCHAL, DANI, 2014)

Após a corrida de eletroforese, os fragmentos de DNA que se desprenderam geram uma imagem que remete a um cometa, onde os danos são quantificados de acordo com o tipo numa escala de 0 a 4, onde 0 indica ausência de danos, enquanto 4 apresenta cauda maior e núcleo de difícil identificação. Os danos são observados por microscopia de fluorescência (Figura 9) (OECD, 2016b; MEZZALIRA, FUNCHAL, DANI, 2014).

Figura 9 – Escala de dano no ensaio cometa: 0 - sem danos; 1- baixo nível de dano; 2 - médio nível de dano; 3 - alto nível de dano; 4 - dano total.



(Fonte: ROCHA, 2016)

Para a análise dos resultados do ensaio, são analisadas 100 células por amostra, sendo pelo método de multiplicação do comprimento da cauda de DNA pelo percentual total de DNA fragmentado presente na cauda, ou pela frequência de danos de acordo com a escala de 0 a 4, formalizando um escore de danos (SHUKLA, 2018).

### 2.4.3. Mutagênese

Mutagênese é o processo indutório de mudanças hereditárias permanentes que afetam o material genético de um organismo, que não é causado por segregação ou recombinação genética, mas sim induzida por agentes químicos, físicos ou biológicos. Esses agentes podem também serem chamados de mutágenos (OLADOSU et al., 2016).

As mutações são comumente causadas pelos mutágenos, mas também podem ser decorrentes de erros espontâneos na replicação, reparo e recombinação do DNA (SLOCZYNSKA et al., 2014).

Em geral, os agentes físicos atuam a partir de radiação (raio X, radiação gama, entre outros) e ionização, que afetam diretamente o material genético do organismo, causando um efeito mutagênico mais potente e danoso. Já os agentes químicos, comparados com os físicos, apresentam um efeito mutagênico menos nocivo, pois interagem com o DNA apenas na forma ativa, enquanto sua forma inativa é conhecida como promutágeno. Dentre os já estudados estão os agentes alquilantes, já que estes interagem com os grupos fosfato, purinas e pirimidinas presentes no material genético, causando mutações cumulativas e por vezes irreversíveis (OLADOSU et al., 2016).

Alguns dos agentes alquilantes são utilizados como fármacos antineoplásicos, e por possuírem uma constituição heterogênea, interagem de formas diferentes com o DNA, como mostra a tabela a seguir (ALMEIDA, et al., 2005).

Tabela 3 – Fármacos antineoplásicos e seus respectivos mecanismos de ação

<b>Fármaco Antineoplásico</b>	<b>Mecanismo de Ação</b>
Análogos das bases nitrogenadas	Inibição da síntese de nucleotídeos
Mostardas nitrogenadas, nitrossureias, complexos tipo cisplatina, bleomicina	Dano direto nas duplas-hélices do DNA
Berenil, Pentamidina e análogos	Interagem na fenda menor do DNA
Proflavina, Acridina, Amsacrina	Alteram as propriedades de pareamento das bases
Doxorrubicina	Inibe a topoisomerase II

(Fonte: adaptado de ALMEIDA et al., 2005).

Dada a relevância do conhecimento do potencial mutagênico dos agentes químicos, há um fármaco antineoplásico que é comumente empregado nos estudos de mutagenicidade, que é a doxorubicina (SLOCZYNSKA et al., 2014).

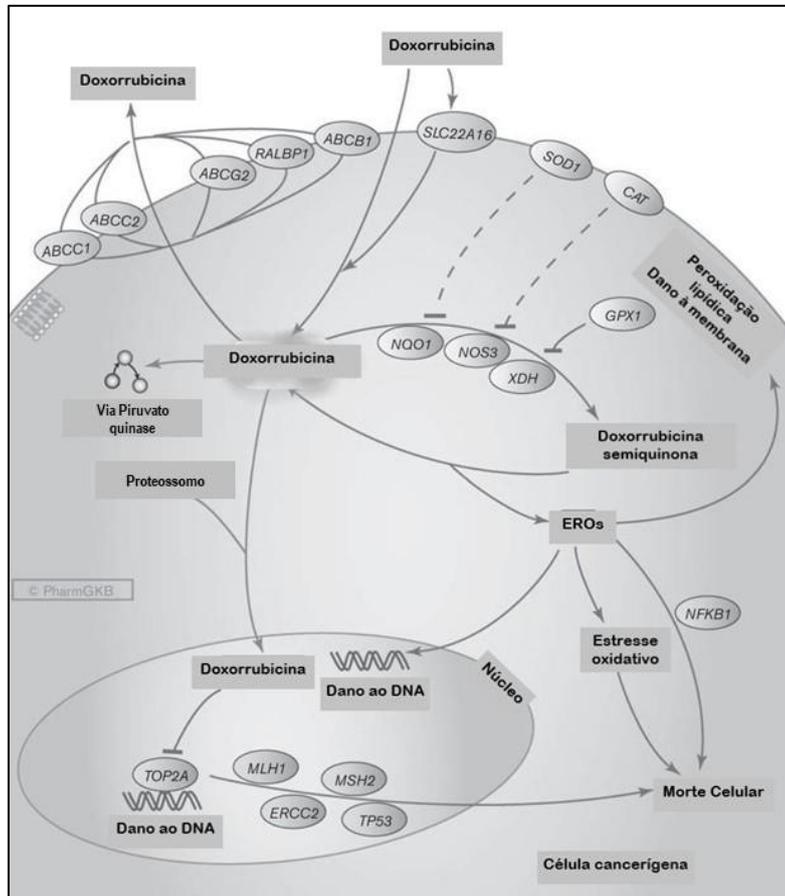
#### **2.4.4. Doxorubicina**

A doxorubicina, ou hidroxildaunorubicina, é um antibiótico pertencente à família das antraciclinas, extraída primeiramente na década de 1970 a partir do *Streptomyces peucetius* var. *caesius* e atualmente utilizada como um fármaco antineoplásico no tratamento de diversos tipos de cânceres, como o de mama, pulmão, mieloma múltiplo, sarcoma de Kaposi, cânceres pediátricos, entre outros (THORN et al., 2011).

Mesmo que detenha de um espectro de ação e eficácia antitumoral maior do que outros fármacos do gênero, somente no cenário científico moderno foi reconhecido seu potencial tóxico, e quando em uso agudo pode acarretar na depleção dos neutrófilos e plaquetas oriundos da medula óssea, taquicardia, arritmia, náuseas, vômitos e hipotensão. Quando em uso crônico, há o risco de desenvolvimento de cardiotoxicidade, cardiopatias que acarretam a falha cardíaca congestiva, presença de atrofia glomerular e aumento da permeabilidade glomerular (RIVANKAR, 2014; SPETH, VAN HOESEL, HAANEN, 2012).

A Figura 10 ilustra o mecanismo de ação tóxica da doxorubicina, que pode ser elucidado de duas maneiras: a primeira ocorre após a administração, onde a doxorubicina atravessa a barreira fosfolipídica e no citoplasma é oxidada em doxorubicina semiquinona (metabólito instável), onde é novamente convertida em doxorubicina, liberando assim espécies reativas de oxigênio (EROs) que danificam o DNA ao causar estresse oxidativo, ativando mecanismos apoptóticos e resultando em morte celular. Na segunda, a doxorubicina penetra na célula tumoral até o núcleo, onde afeta de forma prejudicial a topoisomerase II (TP2), a qual é uma enzima que realiza mudanças topológicas no DNA (recombinação, transcrição, replicação, segregação e condensação de cromossomos), ao converter a TP2 em uma potente toxina celular, impedindo a síntese de ácidos nucleicos por intercalação, a qual impede a duplicação e separação das cadeias de DNA, causando a quebra das fitas de DNA e conseqüentemente, a morte celular (THORN et al., 2011; WU et al, 2011; LEHMANN, et al., 2003).

Figura 10 – Mecanismo de ação tóxica da doxorubicina.



(Fonte: adaptado de THORN, et al., 2011)

Devido à sua atividade tóxica e cardiotóxica, a doxorubicina, assim como outros fármacos da família das antraciclina, tem sido utilizada em estudos com plantas medicinais para se avaliar o efeito antimutagenico destas, já que possuem diversos compostos que podem apresentar efeitos protetores ante à ação da doxorubicina, principalmente pela presença de antioxidantes (MOURA et al., 2013).

#### 2.4.5. Antimutagênese

A antimutagênese é o processo que reverte os efeitos causados por um agente mutagênico natural ou sintético, seja pela capacidade de inativá-lo ou de prevenir a interação deste com o DNA, diminuindo a frequência e reparando as mutações induzidas (BHATTACHARYA, 2011).

Os antimutagênicos podem ser classificados em: desmutagênicos, que são substâncias que inativam o mutágeno de forma integral ou parcial através de quebras enzimáticas ou interações químicas antes do contato do mutágeno com o material genético, e os bioantimutagênicos, que alteram o processo de mutação após o dano causado pelos mutágenos, atuando nos mecanismos de reparo e replicação do DNA atingido, resultando na diminuição da frequência de mutações, sendo o mais eficaz entre os antimutagênicos (BHATTACHARYA, 2011).

Os antimutagênicos podem interagir com o mutágeno através da inativação química ou enzimática, prevenção da formação de EROs, remoção direta do mutágeno ou pela ação antioxidante, sendo estes mais presentes em plantas medicinais que contêm compostos antioxidantes naturais como as vitaminas, flavonoides, compostos fenólicos, carotenoides, cumarinas, entre outros (SLOCZYNSKA et al., 2014).

Por possuírem tais compostos, as plantas medicinais são utilizadas amplamente em estudos de mutagenicidade e antimutagenicidade, sendo o ensaio SMART um dos principais protocolos utilizados nas pesquisas (SLOCZYNSKA et al., 2014).

#### **2.4.6. Teste SMART (*Somatic Mutation and Recombination Test*)**

O *Somatic Mutation and Recombination Test* (teste SMART) é um ensaio da área de Genética Toxicológica que tem por objetivo detectar atividade mutagênica, recombinatória e deletéria de compostos químicos, sintéticos e naturais por meio da *Drosophila melanogaster* (Figura 11) (GRAF et al., 1984).

Figura 11 – *Drosophila melanogaster* com aumento de 40x.



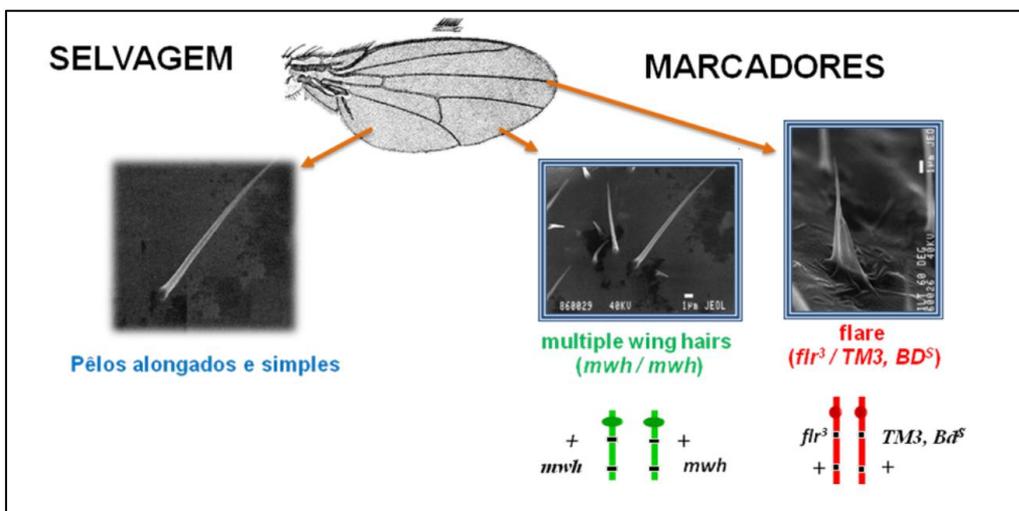
(Fonte: VALADARES, 2000)

O emprego do ensaio com plantas medicinais vem sendo realizado desde 2005, em diversas formas de apresentação (infusão, óleos essenciais, por exemplo), dado que as mesmas podem apresentar propriedades mutagênicas e/ou antimutagênicas em sua composição química que necessitam ser testadas para assegurar o consumo pela população, além da *Drosophila melanogaster* possuir genes ortólogos aos mamíferos em 60%, que tornam os resultados mais fidedignos, aplicáveis e fáceis de correlacionar ao consumo humano (STAATS, et al., 2018; STAMENKOVIĆ-RADAK, ANDJELKOVIC, 2016).

O teste detecta a perda de heterozigose, que representa a alteração fenotípica dos pelos das asas. Para a realização do teste, após o cruzamento, a larva resultante se desenvolve após diferentes divisões mitóticas nas células somáticas, sendo uma destas células os discos imaginais, que dão origem aos pelos das asas (AMORIM, 2016).

Quando uma alteração genética ocorre nos ciclos mitóticos das células somáticas, são formados clones de células mutantes, caracterizando-se como marcadores, que são identificados fenotipicamente como uma mancha mutante na asa do indivíduo adulto, sendo responsáveis pelas mudanças na forma dos pelos, que são: “*mwh*” (*multiple wing hairs*), o qual possui pelos múltiplos localizado no cromossomo 3 (3-3-0), manifestando três ou mais pelos por célula da asa, e “*flr<sup>3</sup>*” (*flare*) que tem como manifestação fenotípica o pelo em forma de chama no cromossomo (3-38.8) (Figura 12) (SALVADORI, MARQUES, RIBEIRO, 2003).

Figura 12 – Pelo selvagem e pelos mutantes (*mwh* e *flr<sup>3</sup>*).

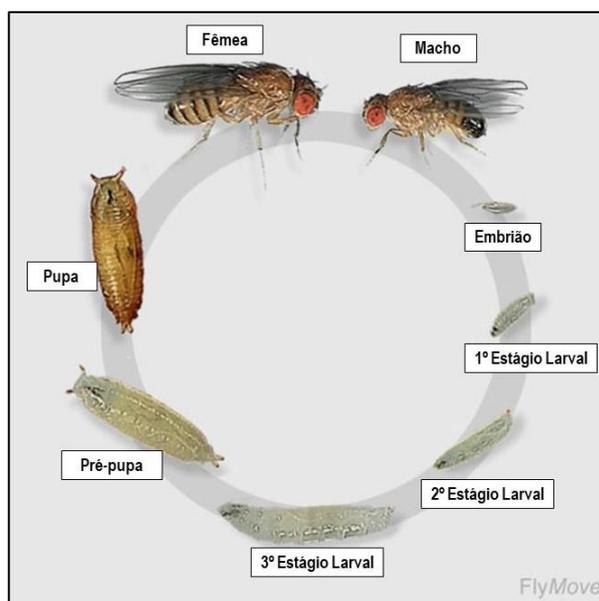


(Fonte: GARAÑHANI, 2018; GRAF et al., 1984)

Para a realização do ensaio, são feitos dois cruzamentos com três linhagens diferentes de *D. melanogaster* que portam os marcadores dos pelos das asas descritos anteriormente: cruzamento padrão ST (do inglês *standard cross*), onde machos homocigotos *mwh/mwh* cruzam-se com fêmeas virgens *flr<sup>3</sup>/In (3LR)TM3, ri p<sup>p</sup> sep l(3) 89 Aa bx<sup>34</sup> e Bd<sup>s</sup>*, e cruzamento de alta bioativação HB (do inglês *high bioactivation cross*), onde machos homocigotos *mwh/mwh* cruzam-se com fêmeas virgens da linhagem ORR/ORR *flr<sup>3</sup> In (3LR)TM3, ri p<sup>p</sup> sep l(3) 89 Aa bx<sup>34</sup> e Bd<sup>s</sup>*, sendo que os cromossomos 1 e 2 desta são oriundos da linhagem ORR, a qual é resistente ao DDT (diclorodifeniltricloroetano, um pesticida) e que possui genes com elevados níveis de enzimas de metabolização que interagem com o citocromo P450 (RIBEIRO, SALVADORI, MARQUES, 2003).

Para a avaliação do potencial mutagênico do composto teste as larvas de cada cruzamento, que após 72h estão em seu estágio de desenvolvimento (Figura 13), são alocadas em béqueres de vidro com meio de cultura, sendo este constituído por purê de batata em flocos industrializado hidratado com água destilada juntamente com as diferentes concentrações do composto estudado. Ao se avaliar a antimutagenicidade de determinada substância, é acrescentada no meio de cultura, além da substância teste, um fármaco indutor de danos mutagênicos, que em geral é o cloridrato de doxorubicina (RIBEIRO, SALVADORI, MARQUES, 2003).

Figura 13 – Ciclo de vida da *Drosophila melanogaster*.



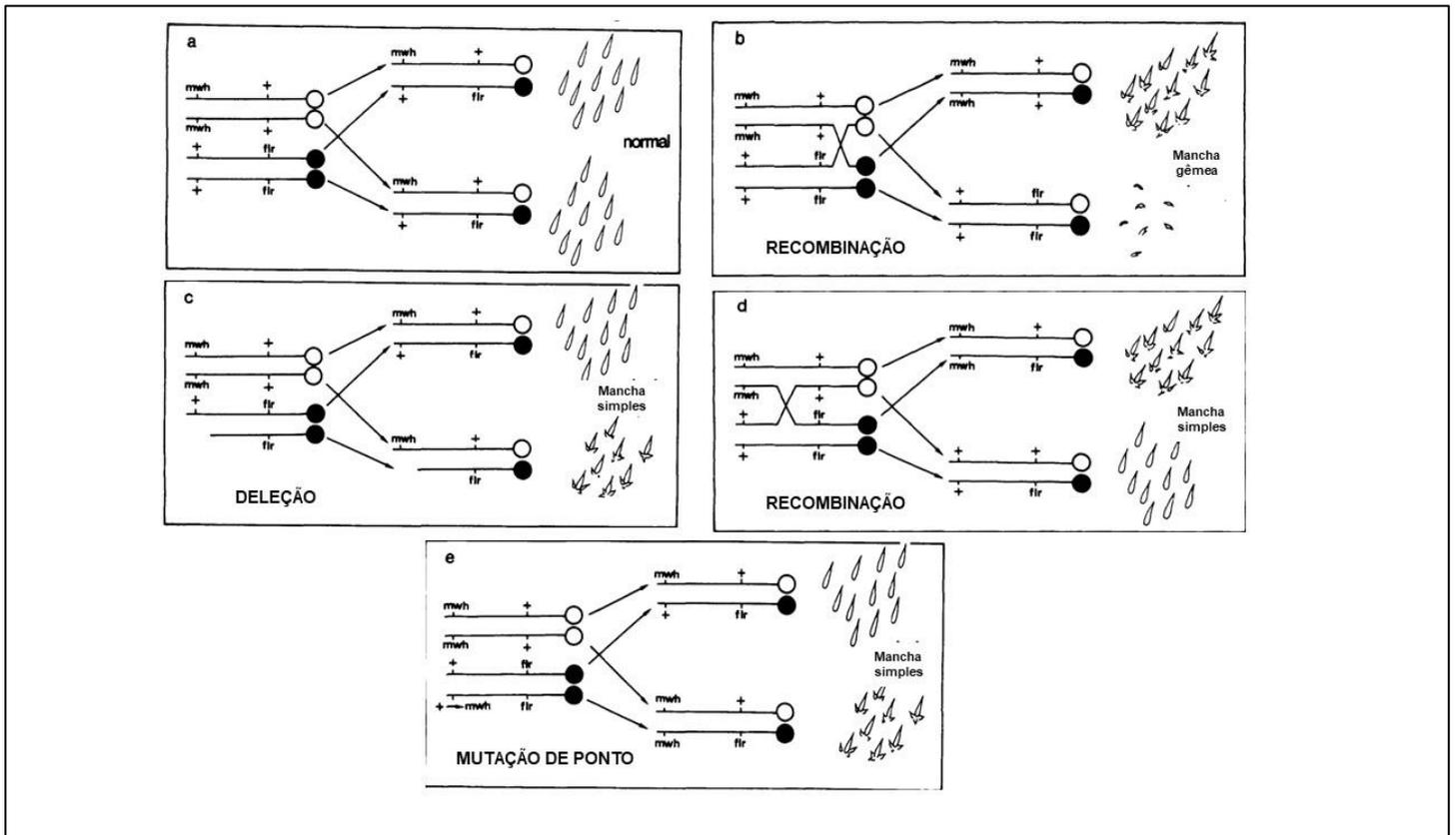
(Fonte: <https://depts.washington.edu/cberglab/wordpress/outreach/an-introduction-to-fruit-flies/>; Acesso em 30/12/2019)

Após o crescimento das larvas em moscas adultas, estas são alocadas em béqueres de vidro contendo etanol 70%, onde as asas de todas as moscas são coletadas e fixadas em lâminas para microscopia com solução de Faure, constituída de goma arábica, glicerol e água, que fixam cinco pares de asas de moscas fêmeas e cinco pares de asas de moscas machos e são analisadas por microscopia de luz com aumento de 400 vezes para a detecção de manchas mutantes (RIBEIRO, SALVADORI, MARQUES, 2003).

O número total de manchas mutantes fornece dados quantitativos da atividade genotóxica do composto estudado, podendo ser classificadas em dois tipos: mancha simples pequena (máximo de duas manchas) ou grande (mais de duas manchas), apresentando o fenótipo *mwh* ou *flr<sup>3</sup>*, que indicam mutações pontuais ou alterações cromossômicas e; manchas gêmeas, que expressam numa única mancha mutante os fenótipos *mwh* ou *flr<sup>3</sup>* e indicam eventos de recombinação genética causadas pela substância teste (Figura 14). Todas essas manchas, tanto simples quanto gêmeas, são identificadas de acordo com o setor da asa da *D. melanogaster* com, os quais são os principais dados para análise estatística, a qual é calculada de acordo com o método de Frei e Wrügler (1988) (Figura 15, Figura 16) (RIBEIRO, SALVADORI, MARQUES, 2003).

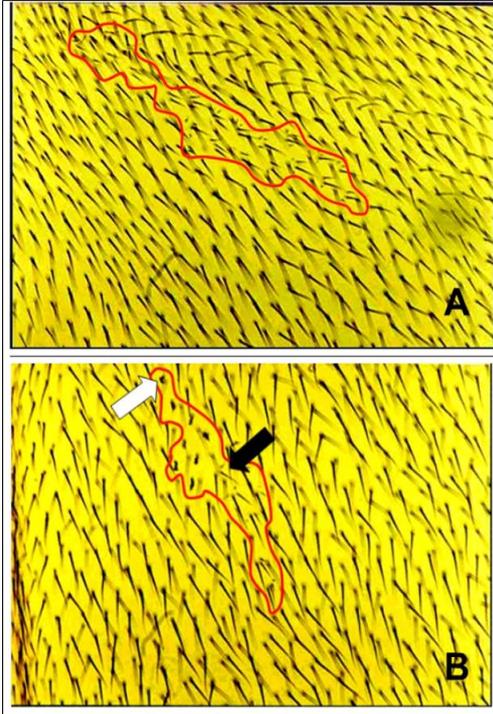
Caso a substância apresente potencial mutagênico, haverá a alteração no pelo da asa como expressão fenotípica. Já se a substância apresentar atividade antimutagênica, haverá a redução de mutações e presença de pelos selvagens (AMORIM, 2016).

Figura 14 – Esquemas genéticos de formação de manchas mutantes com os marcadores *mwh* e *fir*<sup>3</sup> no teste SMART, onde (a) representa a divisão normal sem mutações; (b) mancha gêmea devido à recombinação proximal ao marcador *fir*<sup>3</sup>; (c) evento de deleção que resulta numa mancha simples; (d) recombinação distal que somente manifesta manchas *mwh*; (e) eventos de mutação de ponto.



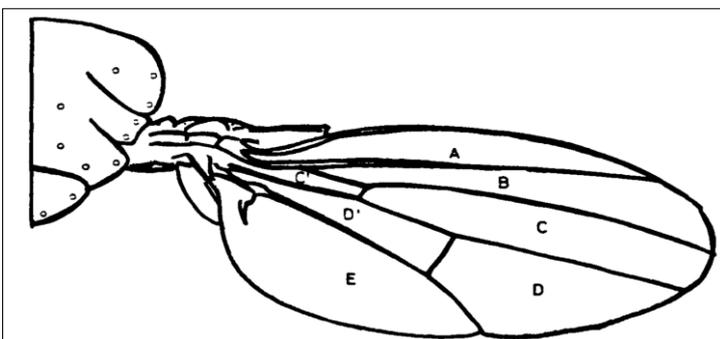
(Adaptado de GRAF et al., 1984).

Figura 15 – Asas de *D. melanogaster* com aumento de 400x, apresentando uma mancha simples “*mwh*” (A) e uma mancha gêmea com pelos “*flr<sup>3</sup>*” (seta branca) e pelos “*mwh*” (seta preta) (B).



(Fonte: VALADARES, 2000).

Figura 16 – Superfície da asa de *D. melanogaster*, dividida nos setores de A à E.



(Fonte: GRAF et al., 1984)

### **3 OBJETIVOS**

#### **GERAL**

- Avaliar a toxicidade aguda, o perfil genotóxico, mutagênico e antimutagênico do extrato dos frutos da *Elaeocarpus serratus*.

#### **ESPECÍFICOS**

- Determinar a DL50 do extrato aquoso dos frutos da *E. serratus*.
- Investigar o potencial genotóxico do extrato de *Elaeocarpus serratus* em células de ratos Wistar in vivo pelo teste do micronúcleo e ensaio cometa.
- Averiguar o potencial mutagênico do extrato de *Elaeocarpus serratus* pelo ensaio SMART.
- Avaliar o potencial antimutagênico do extrato de *Elaeocarpus serratus* associado à doxorrubicina por meio do ensaio SMART.

#### 4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-OKBI, S.Y. Nutraceuticals of anti-inflammatory activity as complementary therapy for rheumatoid arthritis. **Toxicology and Industrial Health**, vol. 30, n.8, p. 738-749, 2014.

ALMEIDA, V.L.; LEITÃO, A.; REINA, L.C.B.; MONTANARI, C.A.; DONNICI, C.L. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Quimica Nova**, vol. 28, n.1, p. 118-129, 2005.

AMORIM, E.M. **Estudo da mutagenicidade de metabólitos secundários liquênicos, utilizando o teste smart e ensaio cometa em células somáticas de *Drosophila melanogaster***. 2016, 53p. Dissertação (Mestrado em Saúde Humana e Meio Ambiente) – Universidade Federal da Pernambuco, Vitória de Santo Antão, 2016.

BARUAH, P.S.; DEKA, K.; LAHKAR, L.; SARMA, B.; BORTHAKUR, S.K.; TANTI, B. Habitat distribution modelling and reinforcement of *Elaeocarpus serratus* L. – A threatened tree species of Assam, India for improvements of its conservation status. **Acta Ecologica Sinica**, vol. 39, n. 1, p. 42-49, 2019.

BHATTACHARYA, S. Natural antimutagens: a review. **Research Journal of Medicinal Plant**, v. 5, n.2, p. 116-126, 2011.

BISWAS, S.; CHOWDHURY, A.S.; DAS, J.; RAIHAN, S.Z. Phytochemical investigation with assessment of cytotoxicity and antibacterial activities of the ethanol extract of *Elaeocarpus serratus*. **American Journal of Plant Physiology**, vol. 7, n. 1, p. 47-52, 2012.

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

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Política e Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. Brasília, 2016.

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

- CARNEIRO, F.M.; SILVA, M.J.P.; BORGES, L.L.; ALBERNAZ, L.C.; COSTA, J.D.C. Tendências dos estudos com plantas medicinais no Brasil. **Revista Sapiência: sociedade, saberes e práticas educacionais**. vol. 3, n. 2, p.44-75, jul-dez., 2014.
- COOK, P. R.; BRAZEL, I. A. Conformational constraints in nuclear DNA. **Journal of Cell Science**, v.22, p. 287-302, 1976.
- DADICH, A.; RISHI, A.; SHARMA, G.; CHANDARA, S. Phytochemical of *Elaeocarpus* with their therapeutic value: a review. **International Journal of Pharma and Bio Sciences**, vol. 4, n. 3, p. 591-598, 2013.
- DE, S.; PARIKH, K.M. Medicinal importance of some common Indian vegetables Part I. **Ancient Science of Life**. vol. IV, n. 4, p. 232-237, 1985.
- DE SOUZA, C.S.H. **Genotoxicidade e citotoxicidade de corantes azoicos em ensaio do micronúcleo *in vivo* (*Swiss albinus*)**. 2015, 73p. Dissertação de Mestrado (Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciência Animal) – Universidade José do Rosário Vellano, Alfenas, 2015.
- DECODIER, I.; KIRSCH-VOLDERS, M. The *in vitro* micronucleus test: from past to future. **Mutation Research**, v. 607, p. 2-4, 2006.
- DÜSMAN, E.; BERTI, A.P.; SOARES, L.C.; VICENTINI, V.E.P. Principais agentes mutagênicos e carcinogênicos de exposição humana. **SaBios: Revista de Saúde e Biologia**, vol. 7, n.2, p.66-81, mai-ago., 2012.
- FLORES, M.; YAMAGUCHI, M.U. Teste do Micronúcleo: uma triagem para avaliação genotóxica. **Revista Saúde e Pesquisa**, v.1, n.3, p.337-340, set-dez, 2008.
- FONSECA, C. A; PEREIRA, D. G. Aplicação da genética toxicológica em planta com atividade medicinal. **Infarma**, v.16, n. 7-8, 2004.
- GARANHANI, R. **Avaliação da atividade mutagênica e antimutagênica da polpa da fruta de *Crescentia cujete* L. (Bignoniaceae) no ensaio SMART**. 2018, 75p. Dissertação de Mestrado (Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste) – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2018.

GEETHA, D.H.; RAJESWARI, M.; JAYASHREE, I. Chemical profiling of *Elaeocarpus serratus* L. by GC-MS. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, vol. 3, n.12, p. 985-987, 2013.

GEETHA, D.H.; JAYASHREE, I.; RAJESWARI, M. GC-MS analysis of ethanolic extract of *Elaeocarpus serratus* L. **European Journal of Pharmaceutical and Medical Research**, v. 2, n.2, p. 296-302, 2015.

GEETHA, D.H.; JAYASHREE, I.; RAJESWARI, M. Anti-diabetic activity of ethanolic extract of *Elaeocarpus serratus* L. in Streptozotocin-induced diabetic rats. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research**, vol. 8, n.1, p.37-42, 2016.

GHANI, A. Monographs: *Elaeocarpus serratus* Linn. In: **Medicinal plants of Bangladesh: Chemical constituents and uses**. Asiatic. Soc. Bangla. Publ, 1998, p.167-168.

GRAF, U.; WÜRGLER, F.E.; KATZ, A.J.; FREI, H.; JUON, H.; HALL, C.B.; KALE, P.G. Somatic Mutation and Recombination Test in *Drosophila melanogaster*. **Environmental Mutagenesis**, v.6, p. 153-188, 1984.

GRAF, U.; ABRAHAM, S.K.; GÚZMAN-RINCÓN, J.; WÜRGLER, F. Antigenotoxicity studies in *Drosophila melanogaster*. **Mutation Research**, v. 402, p. 203-209, 1998.

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

HE, L.; HE, T.; FARRAR, S. JI, L.; LIU, T.; MA, X. Antioxidants maintain cellular redox homeostasis by elimination of reactive oxygen species. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 44, p. 532-553, 2017.

HUANG, W.Y.; FU, L.; LI, C.Y., XU, L.P.; ZHANG, L.X.; ZHANG, W.M. Quercetin, Hyperin, and Chlorogenic Acid Improve Endothelial Function by Antioxidant, Antiinflammatory, and ACE Inhibitory Effects. **Journal of Food Science**, v. 82, n. 5, p. 1239-1246, 2017.

IMRAN, M.; SALEHI, B.; SHARIFI-RAD, J.; GONDAL, T.A.; SAEED, F.; IMRAN, A.; SHAHBAZ, M.; FOKOU, P.V.T.; ARSHAD, M.U.; KHAN, H.; GUERREIRO, S.G.;

MARTINS, N.; ESTEVINHO, L.M. Kaempferol: A key emphasis to its anticancer potential. **Molecules**, v. 24, p. 1-16, 2019.

KLEIN, T.; LONGHINI, R.; BRUSCH, M.L.; MELLO, J.C.P. Fitoterápicos: um mercado promissor. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 30, n.3, p.241-248, 2009.

KNAAPEN, A.M.; GÜNGÖR, N.; SCHINS, R.P.F.; BORM, D.J.; SCHOOTEN, F.J.V.; Neutrophils and respiratory tract DNA damage and mutagenesis: a review. **Mutagenesis**, v.21, n.4, p. 225-236, 2006.

LEHMANN, M., FRANCO, A., VILAR, K.S.P., REGULY, M.L., DE ANDRADE, H.H.R. Doxorubicin and two of its analogues are preferential inducers of homologous recombination compared with mutational events in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Mutation Research/ Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis** v. 539, p. 167-175, 2003.

LIMA, F.F.; BRENDA, C.A.; CARDOSO, C.A.L., DUARTE, M.C.T.; SANJINEZ-ARGANDOÑA, E.J. Evaluation of nutritional composition, bioactive compounds and antimicrobial activity of *Elaeocarpus serratus* fruit extract. **African Journal of Food Science**, vol. 13, n.1, p. 30-37, 2019.

LYKKESFELDT, J.; MICHELS, A.J.; FREI, B. Vitamin C. **Advances in Nutrition**, vol.5, n.1, p.16-18, 2014.

MACHAMMA, Y. **Quality evaluation and value additions of fruits of *Elaeocarpus serratus* L. (Ceylon Olive Tree)**. 2015. 126p. Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal) – Department of Forest Management and Utilization, Kerala Agricultural University, Kerala, India, 2015.

MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C.; VEIGA JUNIOR, V.F. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, vol.25, n.3, p. 429-438, 2002.

MALONE, M.H.; ROBICHAUD, R.C. A Hippocratic screen for pure or crude drug materials. **Lloydia**, v.25, p.320-32, 1962.

- MEIJER, W. Elaeocarpaceae. IN DASSANAYAKE, M.D.; FOSBERG, F.R.; CLAYTON, W.D. (Orgs.). **A revised handbook to the flora of Ceylon**. Vol. IX. New Delhi: Amerind Publishing Co Ltd, 1995, p. 81-90.
- MEZZALIRA, B.; FUNCHAL, C.; DANI, C. Ensaio cometa: avaliação da atividade do calcogênio. **Ciência em Movimento**, n. 33, p.47-55, 2014.
- MOHANAN, N.; SABU, T. Ceylon olive: a lesser known wild edible fruit tree. **Indian Horticulture**, p.7, April-June 2002.
- MØLLER, P. The comet assay: ready for more 30 years. **Mutagenesis**, vol.33, p.1-7, 2018.
- MOURA, L.R.; MARTINS, A.C.; VAZ, L.A.R.; ORPINELLI, S.R.T.; DA SILVA, T. L.; FALEIRO, M.B.R.; SANTOS, S.C.; DE MOURA, V.M.B.D. Extrato hidroalcoólico da casca do pequi (*Caryocar brasiliense*) em ratos submetidos à aplicação de doxorubicina. **Ciência Rural**, v. 43, n.1, p.100-106, 2013.
- OLADOSU, Y.; RAFII, M.Y.; ABDULLAH, N.; HUSSIN, G.; RAMLI, A.; RAHIM, H.A.; MIAH, G.; USMAN, M. Principle and application of plant mutagenesis in crop improvement: a review. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v.30, n.1, p.1-16, 2016.
- ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. Guidelines for the testing of chemicals: **Mammalian erythrocyte micronucleus test**. Paris, 1997.
- ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. Guidelines for the testing of chemicals: **Acute oral toxicity: Up-and-Down Procedure (UDP)**. Paris, 2008.
- ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. Guidelines for the testing of chemicals: **Mammalian erythrocyte micronucleus test**. Paris, 2016a.
- ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. Guidelines for the testing of chemicals: **In Vivo Mammalian Alkaline Comet Assay**. Paris, 2016b.
- PALMA-CONTAR, J.D.; VALIM, S.B.; DE CASTRO, V.S.; SARDETI, V.A.; GUEDES, T.A. Estudos sobre a leitura de eritrócitos micronucleados em camundongos tratados com anabolizantes. **Revista da Educação Física/UEM**, vol. 11, n. 1, p.3-10, 2000.

- PARK, T.; KIM, Y. Phytochemicals as potential agents for prevention and treatment of obesity and metabolic diseases. **Anti-Obesity Drug Discovery and Development**, vol.1, p.1-48, 2011.
- PEIRIS, K. Veralu (*Elaeocarpus serratus* L.). In. PUSHPAKUMARA, D.K.N.G.; GUNASENA, H.P.M.; SINGH, V.P. (Orgs.). **Underutilized fruit trees in Sri Lanka**. Vol. 1. New Delhi: World Agroforestry Centre, 2007, cap. 20, p. 474-485.
- PISOSCHI, A.M.; POP, A.; CIMPEANU, C.; PREDOI, G. Antioxidant capacity determination in plants and plant-derived products: a review. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, vol. 26, p.1-36, 2016.
- PULLAIAH, T. **Encyclopedia of world medicinal plants**. New Delhi: Regency Publication, 2006.
- REZENDE, A.A.A. **Efeito protetor de proantocianidinas de sementes de *Vitis vinífera* L. (Vitaceae) contra efeitos genotóxicos do cloridrato de doxorubicina, em células somáticas de *Drosophila melanogaster***. 2008. 68p. Dissertação (Pós-Graduação em Genética e Bioquímica) – Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2008.
- RIBEIRO, L.R.; SALVADORI, D.M.F.; MARQUES, E.K. **Mutagênese Ambiental**. Canoas: Ed. ULBRA, 2003.
- RIVANKAR, S. An overview of doxorubicin formulations in cancer therapy. **Journal of Cancer Research and Therapeutics**, vol. 10, n.4, p. 853-858, 2014.
- ROCHA, R.S. **Avaliação da genotoxicidade de extratos de Boldo (*Plectranthus ornatos*) e Graviola (*Annona muricata*) através do Ensaio Cometa e do Teste de Micronúcleo em linfócitos humanos**. 2016. 85p. Tese (Pós-graduação em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2016.
- SALES, I.M.S.; SILVA, J.M.; MOURA, E.S.R.; ALVES, F.D.S.; SILVA, F.C.C.; SOUSA, J.M.C.; PERON, A.P. Toxicity of synthetic flavorings, nature identical and artificial, to hematopoietic tissue cells of rodents. **Brazilian Journal of Biology**, vol. 78, n.2, p. 306-310, 2018.

- SHARKER, S.M.D.; SHAHID, I.J. Assessment of antibacterial and cytotoxic activity of some locally used medicinal plants in Sudarban mangrove forest region. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, vol. 4, n.2, p.66-69, 2010.
- SHUKLA, R.K. An introduction to the single cell gel electrophoresis assay: a technique resolving issues in forensic science. **Egyptian Journal of Forensic Sciences**, vol. 8, n. 1, p.1-7, 2018.
- SILVEIRA, P.F.; BANDEIRA, M.A.M.; ARRAIS, P.S.D. Farmacovigilância e reações adversas às plantas medicinais e fitoterápicos: uma realidade. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, vol. 18, n.4, out-dez., p. 618-626, 2008.
- SLOCZYNSKA, K.; POWROZNIK, B.; PEKALA, E.; WASZKIELEWICS, A.M. Antimutagenic compounds and their possible mechanisms of action. **Journal of Applied Genetics**, v.55, p.273-285, 2014.
- SPETH, P.A.J.; VAN HOESEL, Q.G.C.M.; HAANEN, C. Clinical pharmacokinetics of doxorubicin. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 15, p.15-31, 2012.
- STAATS, S.; LÜERSEN, K.; WAGNER, A.E.; RIMBACH, G. *Drosophila melanogaster* as a versatile model organism in food and nutrition research. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, vol. 66, n.15, p.3737-3753, 2018.
- STAMENKOVIĆ-RADAK, M.; ANDJELKOVIC, M. Studying genotoxicity and antimutagenic effects of plant extracts in *Drosophila* test systems. **Botanica Serbica**, v.40, n. 1, p. 21-28, 2016.
- THORN, C.F.; OSHIRO, C.; MARSH, S.; HERNANDEZ-BOUSSARD, T.; MCLEOD, H.; KLEIN, T.E.; ALTMAN, R.B. Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects. **Pharmacogenetic Genomics**, v. 21, n.7, p. 440-446, 2011.
- TRUERA, G.P.; SÁNCHEZ, G.M. Los flavonoides como antioxidantes naturales. **Acta Farmacologica Bonaerense**, vol. 20, n.4, p.297-306, 2001.
- VALADARES, B.L.B. (Org.). **Teste de mutações e recombinações somáticas (SMART)**. Uberlândia: Universidade Federal de Uberlândia, 2000.

VALADARES, M.C. Avaliação de toxicidade aguda: estratégias após a “era do teste DL50”. **Revista Eletrônica de Farmácia**, vol. 3, n.2, p. 93-98, 2006.

VOGEL, E.W.; SZZAKMARY. **Basic Principles and Evaluation of Results of Assays Measuring Genotoxic Damage in Somatic Cells of Drosophila**. 5th ICEMS, Cleveland, 1989.

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

WU, C.C.; LI, T.K.; FAHR, L.; LING, L.Y.; LIN, T.S.; YU, Y.J.; YEN, T.J.; CHIANG, C.W.; CHAN, N.L. Structural basis of type II topoisomerase inhibition by the anticancer drug Etoposide. **Science**, v. 333, p. 459-462, 2011.

ZMARTZY, S. Revision of *Elaeocarpus* (Elaeocarpaceae) section *Elaeocarpus* in Southern India and Sri Lanka. **Kew Bulletin**, vol. 56, p. 405-447, 2001.

## **5 APÊNDICES**

**Artigo 1 (a ser submetido): Revista Journal of Ethnopharmacology (Qualis A2 na área de Medicina II)**

[https://www.elsevier.com/wps/find/journaldescription.cws\\_home/506035?generatepdf=true](https://www.elsevier.com/wps/find/journaldescription.cws_home/506035?generatepdf=true)

**Avaliação da toxicidade aguda, potencial genotóxico, mutagênico e antimutagênico do extrato dos frutos da *Elaeocarpus serratus***

Mi Ye Marcaida Olimpio<sup>a</sup>, Flávio Henrique Souza de Araújo<sup>a</sup>, Leticia Alves Garcia<sup>a</sup>, Luiz Fernando Assunção Benazet<sup>a</sup>, Zaira da Rosa Guterres<sup>b</sup>, Silvia Aparecida Oesterreich<sup>a</sup>

*<sup>a</sup> Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil*

*<sup>b</sup> Laboratório de Citogenética e Mutagênese, Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, Mundo Novo, Mato Grosso do Sul, Brasil*

<sup>a</sup> Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, Rodovia Dourados-Itahum, Km 12, Cidade Universitária, Caixa postal 364m CEP 79804-970, Fone +55 67 3410-2001 ([miye\\_olimpio@hotmail.com](mailto:miye_olimpio@hotmail.com); [flaviobiosmart@gmail.com](mailto:flaviobiosmart@gmail.com); [silviaoesterreich@gmail.com](mailto:silviaoesterreich@gmail.com); [leticiaalvesgarcia@gmail.com](mailto:leticiaalvesgarcia@gmail.com); [luiz.benazet@outlook.com](mailto:luiz.benazet@outlook.com))

<sup>b</sup> Laboratório de Citogenética e Mutagênese, Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, BR 163, Km 20;2, CEP 79980-000, Mundo Novo – MS , Fone +55 67 3923-3181 ([zairaguterres@yahoo.com.br](mailto:zairaguterres@yahoo.com.br))

## Resumo

**Relevância etnofarmacológica:** A *Elaeocarpus serratus* (azeitona do Ceilão) é uma espécie comum oriunda da Índia e seus frutos na medicina popular são empregados no tratamento de disenterias e diarreias, além de estimular o apetite de pacientes hospitalizados. Apesar das propriedades do fruto, não existem registros no Brasil de estudos que validem o uso seguro por humanos.

**Objetivo do estudo:** Avaliar a toxicidade aguda, potencial genotóxico, mutagênico e antimutagênico do extrato de *Elaeocarpus serratus* por meio do teste do micronúcleo, ensaio cometa e ensaio SMART.

**Materiais e métodos:** O extrato aquoso da polpa de *Elaeocarpus serratus* (EAES) foi utilizado para os ensaios de toxicidade aguda em ratas na dose única de 2000 mg/kg para determinação da DL50 e observadas durante 14 dias. Para os ensaios de genotoxicidade, ratos de ambos os sexos foram tratados nas doses de 125, 250, 500 e 1000 mg/kg durante 28 dias, sendo avaliados de acordo com o teste do micronúcleo e ensaio cometa. Para o ensaio SMART, foram utilizados dois cruzamentos com três linhagens de *D. melanogaster*. As larvas foram tratadas com três doses do extrato para avaliar a mutagenicidade, e as mesmas doses foram associadas à doxorrubicina (0,125 mg/mL) para o ensaio de antimutagenicidade.

**Resultados:** O extrato demonstrou baixa toxicidade, além de não ter apresentado genotoxicidade. Devido à sua rica constituição fitoquímica, o extrato mostrou ter uma promissora atividade antimutagênica.

**Conclusão:** A DL50 do EAES é maior do que 2000 mg/kg, além de não possuir potencial genotóxico em células sanguíneas periféricas tampouco atividade clastogênica e aneugênica nas células oriundas da medula óssea de ratos. Não é um agente mutagênico e apresenta atividade antimutagênica, atestada pelo ensaio SMART.

**Palavras-chave:** Micronúcleo, ensaio cometa, *Drosophila melanogaster*, planta medicinal, azeitona do Ceilão.

## 1. Introdução

Desde os tempos mais remotos o emprego de plantas medicinais representa por vezes o único recurso terapêutico de diversos grupos étnicos e comunidades, já que sumariza conhecimentos, práticas e habilidades no diagnóstico, tratamento e prevenção de doenças, preservando a singularidade cultural de cada povo (Maciel et al., 2002; World Health Organization, 2000). O uso de plantas medicinais ainda prevalece principalmente nos países em desenvolvimento, o que impulsiona a investigação de suas características e propriedades terapêuticas para o desenvolvimento e aprimoramento de fitoterápicos (Silveira et al., 2008).

O gênero *Elaeocarpus* pertence à família *Elaeocarpaceae*, que abrange 10 gêneros e 400 espécies de árvores tropicais, onde o gênero *Elaeocarpus* deriva da palavra grega “*elaia*” que significa oliva e “*karpos*” que significa fruto (Meijer, 1995). Dentre as diversas espécies, destaca-se a *Elaeocarpus serratus*. Oriunda da Índia, conhecida como Azeitona do Ceilão, é uma árvore de médio porte, folhas simples e frutos considerados drupas, amplamente distribuída desde a África Oriental até o Brasil (Peiris, 2007).

De sabor adocicado e levemente azedo, o fruto é popularmente consumido em forma de petiscos no Sri Lanka e empresas estão fabricando conservas como alternativa à tradicional azeitona (Peiris, 2007). Na medicina popular, a espécie é utilizada como diurético e estimulante cardiovascular. A decocção da casca é utilizada no tratamento de hemorragias e úlceras, as folhas no tratamento do reumatismo e como antídoto para envenenamentos, enquanto o suco dos frutos é empregado no tratamento de disenterias e diarreias, além de estimular o apetite de pacientes hospitalizados (Dadich et al., 2013).

Ensaio clínicos com os frutos da *E. serratus* relatam o potente efeito antidiabético em associação com a estreptozocina em modelos *in vivo* e *in vitro* (Gheeta et al., 2015, 2016), além da espécie possuir propriedades citoprotetoras (Biswas et al., 2012), antimicrobianas (Sharker, Shahid, 2010) e anti-inflamatórias (Geetha et al., 2018). Tais características se devem principalmente à constituição fitoquímica, que apresenta principalmente hidrocarbonos alifáticos saturados, álcoois saturados, taninos, alcaloides, saponinas, flavonoides (quercetina e campferol), carotenoides, ácido ascórbico (vitamina C), triterpenos ( $\alpha$ -amirina,  $\beta$ -amirina), caracterizando-a como uma importante fonte de compostos antioxidantes (De Lima et al., 2019; Geetha et al., 2015, 2013). Apesar das propriedades que os frutos da *Elaeocarpus serratus*

apresentam, no Brasil os estudos de toxicidade que validem o uso seguro do fruto são escassos. Desta forma, o objetivo da pesquisa foi avaliar a toxicidade aguda, o potencial genotóxico, mutagênico e antimutagênico do extrato aquoso dos frutos de *E. serratus* por meio do teste de toxicidade aguda, teste do micronúcleo e ensaio cometa em roedores e através do ensaio SMART com *Drosophila melanogaster*.

## **2. Materiais e Métodos**

### **2.1 Preparação do extrato**

Os frutos da *E. serratus* foram coletados em Dourados – MS, Brasil (22°09'16.3"S54°48'17.8"W) no estágio maduro (com largura média entre 12,31±1,05 mm) (Kumar et al., 2014) foram selecionados de modo a obter um lote uniforme em relação ao tamanho e ausência de lesões. O material foi lavado e higienizado com uma solução de 0,66% de dicloro-isocianurato de sódio di-hidratado (teor de cloro ativo 3%). Os frutos foram descascados, despulpados e separados sem sementes. As amostras foram armazenadas a -5°C até o preparo do extrato.

O fruto da *E. serratus* foi seco em circulação de ar a 40°C. Após secagem, o material foi moído num processador semi-industrial até obter uma textura em pó, sendo armazenada em ambiente seco a 25°C.

O extrato aquoso dos frutos de *E. serratus* (EAES) foi preparado com a mistura do material seco, em pó, com água destilada onde após homogeneização foi deixado em agitação ao abrigo da luz por três dias à 25°C. Após os três dias, o filtrado obtido foi congelado à -80°C e liofilizado. O extrato liofilizado foi utilizado nos experimentos.

### **2.2 Animais e tratamentos**

Setenta ratos *Wistar* (*Rattus norvegicus*) de ambos os sexos (30 machos e 40 fêmeas), com idade entre 45 a 60 dias foram utilizados na pesquisa. Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central da UFGD e mantidos em gaiolas próprias para roedores (49x34x16cm), com 5 animais por gaiola, sob condições de temperatura (22±2°C) e umidade (40-60%) e com acesso *ad libitum* à água e ração. Os procedimentos experimentais foram conduzidos de acordo com os preceitos éticos de uso de animais em pesquisas e aprovado pela Comissão de Ética para Uso de Animais da UFGD (protocolo n. 24/2018.2).

Para a toxicidade aguda foram estabelecidos dois grupos de fêmeas (n=5 cada), sendo o primeiro tratado com dose única de veículo (água ultrapura Milli-Q® e Tween-80®) via oral por gavagem e o segundo tratado com dose única de 2000mg/kg do EAES associado com água ultrapura Milli-Q® e Tween80® via oral por gavagem. Foram estabelecidos seis grupos de 5 machos e 5 fêmeas, sendo estes: 1) grupo Naive, tratado durante 28 dias com água destilada filtrada por via oral; 2) grupos tratados durante 28 dias com o EAES por via oral (125, 250, 500 e 1000mg/kg associados com água ultrapura Milli-Q® e Tween-80®); 3) grupo controle positivo, tratado com 20mg/kg de peso corporal de ciclofosfamida monohidratada, por via intraperitoneal 24 horas antes da eutanásia.

### **2.3 Toxicidade Aguda**

A toxicidade aguda foi avaliada seguindo o protocolo da OECD (2008). Após a administração, os animais foram observados especialmente durante as primeiras 24 horas, nos períodos de 15, 30 e 60 minutos e a cada 4 horas, e depois uma vez ao dia durante 14 dias consecutivos.

No período do estudo, foram observados sinais tóxicos de caráter geral de acordo com o screening hipocrático (Malone & Robichaud, 1962), sendo avaliados os seguintes parâmetros: variação de peso corporal, sinais clínicos (piloereção, contorções, tremores, convulsões, cianose, ataxia, diarreia) e mudanças comportamentais. Os dados fisiológicos foram observados e registrados diariamente (peso corporal, consumo de água e ração). A mortalidade foi observada para que a dose letal para 50% dos animais (DL50) pudesse ser estimada.

Os animais foram submetidos à eutanásia no 15º dia com sobredose de isoflurano, até ausência de reflexo corneal. Após a confirmação da morte pela análise dos sinais vitais e reflexo corneal, os órgãos vitais (coração, pulmão, fígado, rim direito, baço, ovário direito e útero) foram coletados e analisados macroscopicamente. Notando-se qualquer tipo de alteração no aspecto geral, cor e textura dos órgãos, procedeu-se a análise histopatológica.

### **2.4 Teste do Micronúcleo**

O teste do micronúcleo foi realizado seguindo as diretrizes da *Organisation for Economic Cooperation and Development* (OECD, 2016a). As análises dos eritrócitos

policromáticos foram realizadas a partir de células obtidas da medula óssea dos animais tratados por 28 dias consecutivos.

Logo após a eutanásia, o fêmur direito de cada animal foi removido e separado dos músculos adjacentes. As duas extremidades do fêmur foram cortadas e a medula óssea foi lavada com 1mL de soro fetal bovino e, imediatamente alocada em um microtubo para centrifugação. Após 5 minutos de centrifugação a 1000rpm, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi utilizado para confeccionar as lâminas. As lâminas foram fixadas em metanol por 10 minutos e coradas com Giemsa por 15 minutos.

Para cada amostra, foram analisados 2000 eritrócitos, no intuito de identificar eritrócitos policromáticos micronucleados (indicador de dano genotóxico).

Também foi realizada a razão de eritrócitos policromáticos (PCEs)/normocromáticos (NCEs), o qual é um ensaio citotóxico que avalia se a substância teste provoca efeitos tóxicos nos eritrócitos oriundos da medula óssea. Para avaliar a citotoxicidade do EAES, 1000 NCEs foram contados juntamente com a frequência de PCEs no mesmo campo microscópico, e o indício de dano citotóxico é quando a razão for próxima a 0, enquanto o valor da razão for próximo a 1 não há indício de dano citotóxico (Schimid, 1975).

## **2.5 Ensaio Cometa**

O ensaio cometa foi realizado a partir da análise do sangue periférico e seguiu as diretrizes da OECD (OECD, 2016b).

Antes da eutanásia, cada animal foi anestesiado com associação de quetamina e xilazina e foi realizado um pequeno corte na ponta da cauda para a coleta de sangue, sendo alocado em lâminas com agarose. Em seguida, as lâminas permaneceram em lise por 2 horas, para remoção da membrana celular e extravasamento do DNA. As lâminas com o DNA extravasado foram colocadas numa cuba de eletroforese, embebidas em solução alcalina, e submetidas à corrida eletroforética durante 20 minutos, com temperatura de -4°C e voltagem de 25V e 300mA. Após a corrida, as lâminas foram alocadas em uma solução de neutralização em 3 ciclos de 5 minutos cada. Logo, foram fixadas com álcool absoluto por 10 minutos e refrigeradas ao abrigo da luz. Para a análise, as lâminas foram coradas com brometo de etídeo (0.002 mg/mL) e analisadas

com um microscópio de fluorescência com filtro de excitação (420-490 nm) e filtro de barreira (520 nm).

Foi realizada a leitura de 100 células por animal. O tamanho do cometa formado foi classificado num escore de 0 a 3, onde 0 indica a ausência de fragmentos de DNA; 1 indica cauda menor que o nucleíode; 2 indica cauda com o diâmetro igual ou até duas vezes maior que o nucleíode; 3 indica cauda com o diâmetro três vezes maior do que o nucleíode. Para avaliação do dano genotóxico, considerou-se o tipo e a dimensão do cometa formado em cada amostra.

## **2.6 Somatic Mutation and Recombination Test (Ensaio SMART)**

Todo o procedimento experimental foi realizado no Laboratório de Citogenética e Mutagênese da Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul – Unidade de Mundo Novo.

Foram utilizadas três linhagens de *Drosophila melanogaster*: (1) a linhagem de *mwh* (*multiple wing hairs*), homozigota, com a constituição genética *mwh/mwh*, caracterizada pela presença de pelos múltiplos e com asas de borda simples (2) a linhagem *flare3* (*flr<sup>3</sup>*), caracterizada por pelos em formato de chama e apresentar o alelo *flr<sup>3</sup>* em homozigose, com a constituição genética *flr<sup>3</sup>/In TM<sup>3</sup> Bd<sup>s</sup>* e asas de borda recortada; (3) a linhagem Oregon *flare<sup>3</sup>* (ORR *flr<sup>3</sup>*), que possui os cromossomos 1 e 2 da linhagem Oregon R (resistentes a DDT) e genes que permitem um alto nível de bioativação com as enzimas do citocromo P450, com a constituição genética *ORR;flr3/In(3LR)TM3, ri pp sep l(3)89Aa bx34e and a BdS*, caracterizada por asas de borda recortada (Graf, Schaik, 1992; Graf et al., 1984).

Dois cruzamentos foram realizados, sendo estes: cruzamento padrão (ST – *standard*) entre machos *mwh* e fêmeas *flr<sup>3</sup>* virgens, e o cruzamento de alta bioativação (HB – *high bioactivation*) entre machos *mwh* e fêmeas ORR *flr<sup>3</sup>* virgens. Os ovos de cada cruzamento foram coletados após 8 horas em frascos de cultura contendo uma base de ágar-ágar (0,04 g/mL), fermento biológico e suplementado com açúcar. As larvas que eclodiram num período de 72h foram lavadas com água corrente e coletadas com uma peneira. Os grupos de larvas de cada cruzamento foram transferidos para frascos de vidro identificados, tendo como base um meio alternativo constituído por 1,5g de flocos de purê de batata industrializado (Yoki®), seguindo os seguintes protocolos (mutagenicidade e antimutagenicidade, respectivamente): 1) três concentrações do EAES (1,25, 2,5 e 5,0 mg/mL associados com água destilada e Tween-80®);

2) três concentrações dos EAES (1,25, 2,5 e 5,0 mg/mL associados com água destilada e Tween-80®) em associação com o cloridrato de doxorubicina (0.125 mg/mL). O controle negativo de ambos os protocolos recebeu veículo (3% etanol, 1% de Tween-80® e água destilada).

As moscas adultas apresentaram genótipo *mwh+/flr<sup>3</sup>+* (trans-heterozigoto marcado – MH) e *mwh + / + TM3, Bd<sup>S</sup>* (heterozigoto balanceado – BH), foram coletadas e fixadas em álcool 70%. As asas foram fixadas em lâminas de vidro com solução de Fauvre (30g de goma Arábica, 50g de hidrato de cloral, 20mL de glicerol e 50mL de água) e analisadas por microscopia de luz, com aumento de 400x, para identificação dos tipos de mutações. Todas as asas apresentaram o marcador heterozigoto *mwh/flr<sup>3</sup>*, sendo possível observar três tipos de manchas: simples pequena (uma a duas manchas), simples grande (duas ou mais manchas) e manchas gêmeas (ambos os subclones *mwh* e *flr<sup>3</sup>*).

## 2.7 Análise Estatística

Os resultados da toxicidade aguda, teste do micronúcleo e ensaio cometa foram expressos por média  $\pm$  desvio padrão para cada grupo de tratamento. A avaliação estatística para o teste do micronúcleo e o ensaio cometa foi realizado pela análise de variância (ANOVA) seguido pelo teste de Tukey, considerando o valor de  $p < 0,05$  para que fossem consideradas diferenças significativas entre os grupos tratados e controle. Para a confecção dos gráficos foi utilizado o software GraphPad Prism 8®.

Para a análise estatística do ensaio SMART, foi utilizado o método de Frei e Wrügler (1988), onde os achados foram distinguidos pelo tipo e tamanho de manchas mutantes e analisados por teste qui-quadrado bi-caudal para as proporções, com nível de significância de  $\alpha = \beta = 0.05$ , onde o diagnóstico estatístico foi positivo (+), negativo (-) ou inconclusivo (i). Para a substância ser considerada mutagênica o número total de manchas *mwh* nas concentrações estudadas deve ser igual ao dobro do controle negativo. Já para ser considerada antimutagênica, considera-se uma substância com efeito protetor, aquela concentração que reduzir o número total de manchas acima de 30% quando comparada com o controle positivo.

## 3. Resultados

### 3.1 Toxicidade Aguda

Após a exposição à dose de 2000mg/kg do EAES, não houve mortalidade entre os animais estudados. As fêmeas tratadas com o EAES não apresentaram sinais clínicos de toxicidade, tampouco alterações comportamentais pelo screening hipocrático durante todo o período do estudo. A média de peso variou entre  $187.50g \pm 11.47$  para o grupo controle e  $186.60g \pm 15.95$  para o tratado. Não houve alterações significativas no ganho de peso e consumo de água e ração entre os grupos (Tabela 1).

Ao analisar os órgãos vitais, não foram observadas alterações macroscópicas, não havendo a necessidade de encaminhamento para análise histopatológica, e não houve diferenças no peso dos órgãos entre os grupos (Tabela 2).

### **3.2 Teste de Micronúcleo**

A média de peso dos animais variou entre  $150,40g \pm 11,93$  para as fêmeas e  $256,5g \pm 25,94$  para os machos. Todos os grupos de ambos os sexos tratados com o EAES apresentaram frequência menor de micronúcleos quando comparado com o controle positivo, mas sem diferenças estatísticas significativas entre si (Figura 1).

A tabela 3 apresenta a razão de eritrócitos policromáticos e eritrócitos normocromáticos (PCE/NCE), onde somente foram observadas diferenças estatísticas no grupo controle positivo de ambos os sexos ( $0,19 \pm 0,04$  – fêmeas;  $0,20 \pm 0,02$  – machos), mostrando que este grupo não apresentou efeito citoprotetor, diferente das doses do EAES, as quais apresentaram valores próximos à 1.

### **3.3 Ensaio Cometa**

Em relação aos resultados do ensaio cometa, somente no grupo controle positivo houve diferenças estatísticas significativas no número de células danificadas e no escore final de danos (Figura 2). O número de células danificadas e o escore de danos no grupo Naive e nos tratados com o EAES foi menor em comparação com o controle positivo, mas sem diferenças estatísticas entre si (Tabela 4).

### **3.4 Ensaio SMART**

A tabela 5 apresenta os resultados do protocolo de mutagenicidade dos descendentes dos cruzamentos ST e HB que apresentaram o fenótipo *mwh/flr<sup>3</sup>*, tratados com três doses

distintas do EAES. O controle negativo apresentou uma frequência no total de manchas mutantes de 0,30 nos descendentes do cruzamento ST e 0,50 nos descendentes do cruzamento HB, enquanto a frequência de manchas entre as doses do EAES variou entre 0,10 a 0,35 no cruzamento ST e entre 0,20 a 0,80 no cruzamento HB, não demonstrando diferenças estatísticas quando comparados com o controle negativo.

Já na tabela 6, são apresentados os resultados do protocolo de antimutagenicidade dos descendentes dos cruzamentos ST e HB que apresentaram o fenótipo *mwh/flr<sup>3</sup>*, associados com a doxorubicina. O controle negativo apresentou uma frequência de formação de manchas mutantes de 0,30 e 0,50, referente aos dois cruzamentos, respectivamente. Com o controle positivo, a frequência de manchas mutantes foi de 2,60 no cruzamento ST e 6,75 no cruzamento HB.

Comparando os descendentes tratados com as concentrações do EAES no cruzamento ST, a frequência de manchas mutantes variou entre 1,55 a 4,35. Já no cruzamento HB, a frequência de manchas mutantes entre os descendentes tratados com o EAES variou entre 2,55 a 3,65. Com exceção da dose de 1,25 mg/mL do EAES no cruzamento ST, todas as doses do EAES conseguiram reduzir os efeitos da doxorubicina, variando entre 67,30% e 94,20% no cruzamento ST, e entre 45,90% a 62,20% no cruzamento HB.

#### **4. Discussão**

O presente trabalho é o primeiro que avalia a toxicidade aguda, potencial genotóxico, mutagênico e antimutagênico dos frutos de *E. serratus* no Brasil.

Os estudos de toxicidade clínica são realizados para avaliar doses seguras para o uso de determinada espécie vegetal, sendo um desses testes o de toxicidade aguda, atualmente regulamentado pela diretriz 425 da *Organisation for Economic Co-operation and Development* (OECD), o qual determina a dose letal mediana através de exposição única ou múltipla à substância teste na sua maior dosagem *in vivo*, em geral com roedores (OECD, 2008).

O EAES provou possuir baixa toxicidade, evidenciado pela ausência de mortalidade nos animais avaliados e de alterações comportamentais e fisiológicas durante todo o período do estudo, os quais corroboram com os dados de Gheeta, Jayashree, Rajeswari (2016), que em um estudo com o extrato etanólico dos frutos da *E. serratus* avaliou a toxicidade aguda nas doses

de 1000 a 5000mg/kg, onde não foi observada mortalidade ou quaisquer efeitos tóxicos em todas as doses avaliadas.

A área de genética toxicológica auxilia na identificação de agentes químicos ou naturais que detém a capacidade de causar alterações no DNA nas células somáticas ou germinativas, que podem ser perpetuadas aos descendentes por malformações e até mesmo na formação de tumores (Düsmen et al., 2012; Fonseca, Pereira, 2004). Para identificar tais agentes e classificá-los como genotóxicos ou não, existem uma gama de ensaios *in vitro* e *in vivo*, tais como ensaios com *Drosophila melanogaster*, ensaio cometa e teste do micronúcleo que são comumente utilizados na prática clínica e que proporcionam informações relevantes e fidedignas (Sales et al., 2018).

O teste do micronúcleo possibilita a detecção de agentes clastogênicos (capazes de realizar a quebra de cromossomos) e aneugênicos (que induzem a segregação cromossômica anormal) (Flores, Yamaguchi, 2008). Neste estudo o EAES não provocou o aparecimento de micronúcleos nos eritrócitos policromáticos oriundos da medula óssea em quaisquer das doses adotadas, quando comparado com o Naive. Ao analisar a razão de eritrócitos policromáticos e normocromáticos é possível determinar o potencial citotóxico da substância teste por meio de uma escala de 0 a 1, onde quando mais próximo a 0 mais citotóxica a substância, enquanto que quanto mais próximo a 1 mais a substância caracteriza-se como citoprotetora (Suzuki et al., 1989). Os achados do estudo indicam que o EAES possui um potencial efeito citoprotetor, ao apresentar uma razão próxima a 1 e sem diferenças estatísticas significativas comparado com o grupo Naive, não afetando a produção de novos eritrócitos.

O ensaio cometa permite detectar lesões diretas ao material genético que são causadas por agentes genotóxicos, sejam eles sintéticos ou oriundos de plantas medicinais (Ribeiro et al., 2003). Os animais tratados com o EAES também não demonstraram danos ao DNA pelo ensaio cometa comparados ao Naive, onde a diferença foi observada apenas no grupo controle positivo que foi tratado com a ciclofosfamida, confirmando concomitantemente com os achados do teste do micronúcleo que a administração do EAES não causou efeitos genotóxicos.

A presença de compostos bioativos tais como flavonoides (quercetina e campferol), taninos, carotenoides e vitamina C na polpa da *E. serratus* caracteriza o fruto como uma rica fonte de compostos antioxidantes (De Lima et al., 2019), os quais previnem a formação de

espécies reativas de oxigênio, protegendo o organismo da ação tóxica de agentes alquilantes como a ciclofosfamida e a doxorrubicina, que são considerados altamente genotóxicos e mutagênicos devido à interferência destes na replicação e transcrição do DNA, que interrompem a função do ácido nucleico, induzindo à apoptose devido à geração de espécies reativas de oxigênio (Thorn, et al., 2011).

Além dos frutos, as demais partes da *E. serratus* detém de outros compostos fenólicos como a miricetina, alcaloides, saponinas e taninos presentes nas folhas da espécie, e em outras espécies do gênero *Elaeocarpus*, como nas folhas da *Elaeocarpus sphaericus* há a presença de quercetina e taninos, a qual reforça a capacidade antioxidante e protetora contra danos causados ao material genético (Liyanarachchi et al., 2018; Dadich, et al., 2013).

O ensaio SMART é capaz de detectar atividade mutagênica, deletéria e recombinatória de compostos naturais, químicos e sintéticos ao utilizar a *Drosophila melanogaster* como organismo-teste para identificar perda de heterozigose (Graf et al., 1984). Devido a *D. melanogaster* apresentar 60% de seus genes ortólogos aos mamíferos, é um teste confiável e rápido, além de ser o principal em associar danos genotóxicos a substâncias após sua biotransformação (Staats et al., 2018; Lombardot et al., 2015).

No ensaio de mutagenicidade realizado no estudo, a dose de 1,25mg/mL tratada com o EAES do cruzamento ST apresentou a menor quantidade de manchas mutantes quando comparadas ao controle negativo. Quando comparado com o cruzamento HB, caracterizado pela alta bioativação das enzimas do citocromo P450, a dose de 2,5mg/mL do EAES foi a que apresentou menor taxa de formação de manchas mutantes. Na análise estatística de ambos os cruzamentos, não houve diferenças entre os grupos, podendo-se afirmar que o EAES não é considerado um agente mutagênico por não promover eventos de recombinação genética.

Os antimutagênicos podem interagir com o agente mutagênico através da inativação química ou enzimática, prevenção da formação de espécies reativas de oxigênio, remoção direta do mutágeno ou pela ação antioxidante, sendo estes mais presentes em plantas medicinais que contem compostos antioxidantes naturais (Sloczynska et al., 2014). No ensaio de antimutagenicidade, no cruzamento ST, com exceção da dose de 1,25 mg/mL, as demais doses reduziram a ação da doxorrubicina numa porcentagem variante entre 67,30% e 94,20%, conseqüentemente apresentando um menor número de mutações. No cruzamento HB, todas as

doses do EAES foram capazes de reduzir os eventos de recombinação genética da doxorubicina, podendo-se afirmar que o EAES possui atividade antimutagênica contra a doxorubicina nas células somáticas da *D. melanogaster*.

Tais informações são de caráter inédito e que permitem a realização de novos estudos com o fruto da *E. serratus* para investigar outros possíveis efeitos terapêuticos e farmacológicos.

## 5. Conclusão

O EAES apresenta baixa toxicidade e a DL50 é maior do que 2000mg/kg. Neste estudo não apresentou potencial genotóxico em células sanguíneas periféricas tampouco atividade clastogênica e aneugênica nas células oriundas da medula óssea de ratos. O extrato não é um agente mutagênico e apresenta atividade antimutagênica, atestada pelo ensaio SMART.

## 6. Apoio Financeiro

Essa pesquisa recebeu apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) vinculada ao Ministério da Educação do Brasil, por meio de bolsa concedida para a autora principal.

## 7. Referências

Biswas, S.; Chowdhury, A.S.; Das, J.; Raihan, S.Z., 2012. Phytochemical investigation with assessment of cytotoxicity and antibacterial activities of the ethanol extract of *Elaeocarpus serratus*. Am. J. Plant Physiol. 7, 47-52. <http://doi.org/10.3923/ajpp.2012.47.52>.

Brasil, 2013. Guia para condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos. Versão 2.

Dadich, A., Rishi, A., Sharma, G., Chandra, S. 2013. Phytochemicals of *Elaeocarpus* with their therapeutic value: a review. Int J Pharm Bio Sci. 4, 591-598.

De Lima, F.F., Brenda, C.A., Cardoso, C.A.L., Duarte, M.C.T., Sanjinez-Argandoña, E.J., 2019. Evaluation of nutritional composition, bioactive compounds and antimicrobial activity of *Elaeocarpus serratus* fruit extract. African J. Food Sci. 13, 30-37. <https://doi.org/10.5897/AJFS2018.1760>.

- Düsman, E.; Berti, A.P.; Soares, L.C.; Vicentini, V.E.P., 2012. Principais agentes mutagênicos e carcinogênicos de exposição humana. *SaBios: Rev. Saúde e Biol* 7, 66-81.
- Flores, M., Yamaguchi, M.U., 2008. Teste do Micronúcleo: uma triagem para avaliação genotóxica. *Revista Saúde e Pesquisa* 1, 337-340.
- Fonseca, C.A; Pereira, D.G., 2004. Aplicação da genética toxicológica em planta com atividade medicinal. *Infarma* 16, 51-54.
- Frei, H., Würigler, F.E., 1988. Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative, or inconclusive result. *Mutat. Res. Mutagen. Relat. Subj.* 203, 297-308; [https://doi.org/10.1016/0165-1161\(88\)90019-2](https://doi.org/10.1016/0165-1161(88)90019-2).
- Geetha, D.H.; Rajeswari, M.; Jayashree, I., 2013. Chemical profiling of *Elaeocarpus serratus* L. by GC-MS. *Asian Pac J Trop Biomed* 3, 985-987. [http://doi.org/10.1016/S2221-1691\(13\)60190-2](http://doi.org/10.1016/S2221-1691(13)60190-2).
- Geetha, D.H.; Jayashree, I.; Rajeswari, M., 2015. GC-MS analysis of ethanolic extract of *Elaeocarpus serratus* L. *Eur J. Pharm. Med. Res.* 2, 296-302.
- Geetha, D.H.; Jayashree, I.; Rajeswari, M., 2016. Anti-diabetic activity of ethanolic extract of *Elaeocarpus serratus* L. in Streptozotocin-induced diabetic rats. *Int. J. Pharm. Sci. Drug Res.* 8, 37-42. <https://doi.org/10.25004/IJPSDR.2016.080106>.
- Geehta, D.H., Jayashree, I., Rajeswari, M. 2018. In vivo anti-arthritic activity of ethanolic extracts of *Elaeocarpus serratus* L. *Int J Pharm Sci Rev Res.* 48, 92-97.
- Graf, U., van Schaik, N., 1992. Improved high bioactivation cross for the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.* 271, 59-67. [https://doi.org/10.1016/0165-1161\(92\)90032-H](https://doi.org/10.1016/0165-1161(92)90032-H).
- Graf, U., Würigler, F.E., Katz, A.J., Frei, H., Juon, H., Hall, C.B., Kale, P.G., 1984. Somatic Mutation and Recombination Test in *Drosophila melanogaster*. *Environ. Mutagen.* 6, 153-188. <https://doi.org/10.1002/em.2860060206>.
- Kumar, V., Ajeesh, R., Vidyasagan, K., Babu, S., 2014. Variation in pulp content and physical characters of *Elaeocarpus serratus* L. fruits in different landuse patterns of Western Ghats, India. *Eco. Env. & Cons.* 21, p. 1-2.

- Lombardot, B., Oh, C.T., Kwak, J., Genovesio, A., Kang, M., Hansen, M.A.E., Han, S.J., 2015. High-throughput in vivo genotoxicity testing: An automated readout system for the somatic mutation and recombination test (SMART). *PLoS One* 10, 1-11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121287>.
- Liyanaarachchi, G.D., Samarasekera, J.K.R.R., Mahanama, K.R.R., Hemalal, K.D.P. 2018. Tyrosinase, elastase, hyaluronidase, inhibitory and antioxidant activity of Sri Lankan medicinal plants for novel cosmetics. *Indus. Crops & Product*. 111, 597-605. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.11.019>.
- Maciel, M.A.M., Pinto, A.C., Veiga Junior, V.F. 2002. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. *Quim Nova* 25, 429-438. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422002000300016>.
- Malone, M.H., Robichaud, R.C. 1962. A Hippocratic screen for pure or crude drug materials. *Lloydia*. 25, 320-332.
- Meijer, W., 2009. Elaeocarpaceae, in Dassanayake, M.D., Fosberg, F.R., Clayton, W.D. (Eds.), *A revised handbook to the flora of Ceylon*. New Delhi, Amerind Publishing Co Ltd, pp. 81-90.
- OECD, 2008. OECD Guideline for the testing of chemicals. N° 425: Acute Oral Toxicity – Up-and-Down Procedure (UDP).
- OECD, 2016a. OECD Guideline for the testing of chemicals. N°474: Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test.
- OECD, 2016b. OECD Guideline for the testing of chemicals. N° 489: In Vivo Mammalian Alkaline Comet Assay.
- Peiris, K., 2007. Veralu (*Elaeocarpus serratus* L.) in Pushpakumara, D.K.N.G., Gunasena, H.P.M., Singh, V.P. (Eds.), *Underutilized fruit trees in Sri Lanka*. New Delhi, World Agroforestry Centre, pp. 474-485.
- Pisoschi, A.M., Pop, A., Cimpeanu, C.; Predoi, G., 2016. Antioxidant capacity determination in plants and plant-derived products: a review. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 26, pp.1-36. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/9130976>.

Ribeiro, L.R., Salvadori, D.M.F., Marques, E.K., 2003. *Mutagênese Ambiental*, ed. ULBRA, Canoas.

Sales, I.M.S., Silva, J.M., Moura, E.S.R., Alves, F.D.S., Silva, F.C.C., Sousa, J.M.C., Peron, A.P., 2018. Toxicity of synthetic flavorings, nature identical and artificial, to hematopoietic tissue cells of rodents. *Braz. J. Biol.* 78, pp. 306-310. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.07716>.

Sharker, S.M.D., Shahid, I.J., 2010. Assessment of antibacterial and cytotoxic activity of some locally used medicinal plants in Sudarban mangrove forest region. *Afr. J. Pharm. Pharmacol.* 4, pp.66-69.

Silveira, P.F., Bandeira, M.A.M., Arrais, P.S.D., 2008. Farmacovigilância e reações adversas às plantas medicinais e fitoterápicos: uma realidade. *Rev. Bras. Farmacogn.* 18, pp. 618-626. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2008000400021>.

Sloczynska, K., Powroznik, B., Pekala, E., Waszkielewics, A.M., 2014. Antimutagenic compounds and their possible mechanisms of action. *J Appl Genetics.* 55, pp.273-285. <http://doi:10.1007/s13353-014-0198-9>.

Sponchiado, G., Adam, M.L., Silva, C.D., Silva Soley, B., De Mello-Sampayo, C., Cabrini, D.A., Correr, C.J., Otuki, M.F., 2016. Quantitative genotoxicity assays for analysis of medicinal plants: A systematic review. *J. Ethnopharmacol.* 178, 289-296. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2015.10.026>.

Suzuki, Y., Nagae, Y., Li, J., Sakaba, H., Mozawa, K., Takahashi, A., Shimizu, H., 1989. The micronucleus test and erythropoiesis. Effects of erythropoietin and a mutagen on the ratio of polychromatic to normochromatic erythrocytes (P/N ratio), *Mutag.* 4, pp. 420-424. <https://doi.org/10.1093/mutage/4.6.420>.

Staats, S., Lüersen, K., Wagner, A.E., Rimbach, G., 2018. *Drosophila melanogaster* as a versatile model organism in food and nutrition research. *J. Agric. Food Chem.* 66, p.3737-3753. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b05900>.

Thorn, C.F., Oshiro, C., Marsh, S., Hernandez-Boussard, T., Mcleod, H., Klein, T.E., Altman, R.B., 2011. Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects. 2011.Pharmacogenet Genomics. 21, pp. 440-446.

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

## Figuras

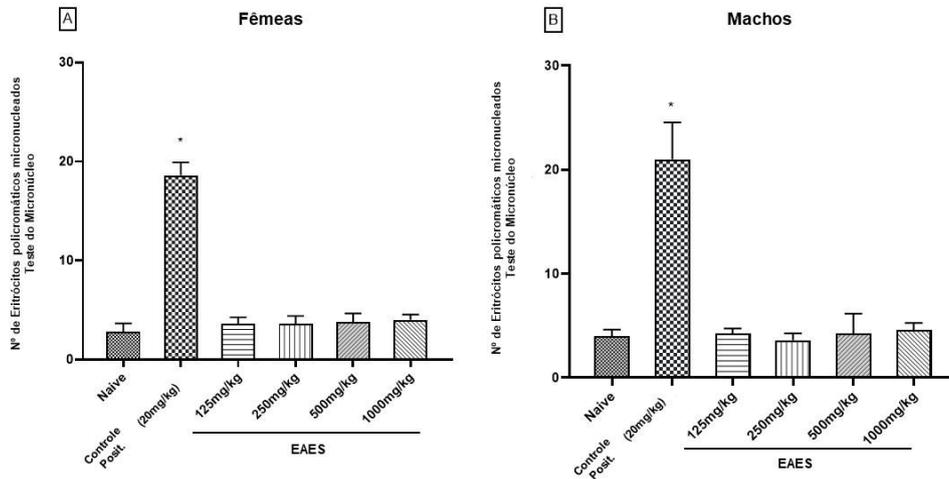


Figura 1 – Efeitos do tratamento com o extrato aquoso dos frutos da *E. serratus* (EAES) e ciclofosfamida (controle positivo) na contagem de eritrócitos policromáticos micronucleados da medula óssea de ratos Wistar. Naive (água ultra pura Milli-Q® + Tween-80 ®) via oral, controle positivo (20mg/kg de ciclofosfamida monohidratada) via i.p., EAES (125-250-500-1000mg/kg) via oral. \* Diferenças estatísticas significativas ( $p < 0.05$ ; ANOVA/Tukey)

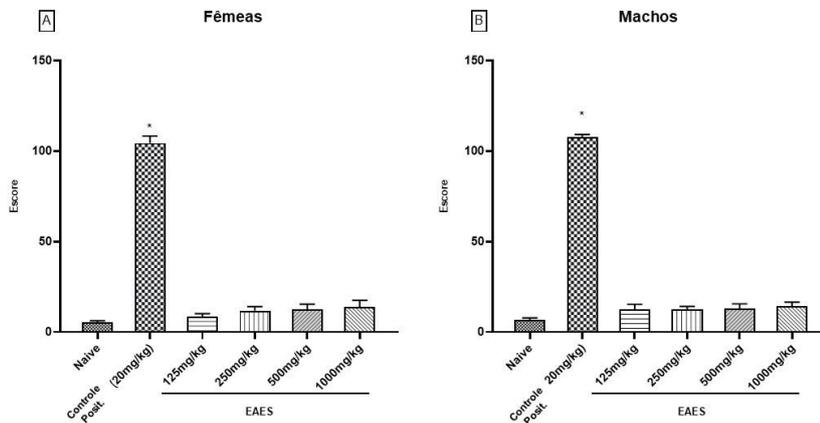


Figura 2 – Efeitos do tratamento com o extrato aquoso dos frutos da *E. serratus* (EAES) e ciclofosfamida (controle positivo) no escore final de danos ao DNA em ratos Wistar. Naive (água ultra pura Milli-Q® + Tween-80 ®) via oral, controle positivo (20mg/kg de ciclofosfamida monohidratada) via i.p., EAES (125-250-500-1000mg/kg) via oral. \* Diferenças estatísticas significativas ( $p < 0.05$ ; ANOVA/Tukey)

## Tabelas

**Tabela 1** - Ganho de peso e consumo de água e ração de ratas tratadas oralmente durante 14 dias em toxicidade aguda com extrato aquoso do fruto de *E. serratus*

	Toxicidade aguda	
	Controle	2000 mg/kg
<b>Fêmea</b>		
Peso inicial (g)	178.00 ± 18.55	178.00 ± 18.55
Peso final (g)	187.50 ± 11.47	186.60 ± 15.95
Ganho de peso corporal (%)	21.94 ± 4.33	18.32 ± 1.47
Consumo de ração (g/dia)	64.31 ± 12.85	71.69 ± 19.32
Consumo de água (mL/dia)	151.82 ± 47.92	172.00 ± 65.12

Valores expressos em média ± desvio padrão. n=10 animais. \*p<0,05 (ANOVA) comparado ao grupo controle

Fonte: (Elaborado pela autora, 2020).

**Tabela 2** – Peso dos órgãos (g/100g de peso corporal) de ratas tratadas oralmente durante 14 dias em toxicidade aguda com extrato aquoso do fruto de *E. serratus*

	Toxicidade aguda	
	Controle	2000 mg/kg
<b>Fêmea</b>		
Fígado	3.80 ± 0.32	3.35 ± 0.32
Rim	0.40 ± 0.02	0.37 ± 0.02
Baço	0.24 ± 0.01	0.22 ± 0.03
Coração	0.30 ± 0.02	0.30 ± 0.02
Pulmão	0.59 ± 0.07	0.57 ± 0.08
Ovário	0.03 ± 0.00	0.02 ± 0.00
Útero	0.20 ± 0.08	0.28 ± 0.13

Valores expressos em média ± desvio padrão. n=10 animais. \*p<0,05 (ANOVA) comparado ao grupo controle

Fonte: (Elaborado pela autora, 2020).

**Tabela 3** – Frequência média  $\pm$  desvio padrão do número de eritrócitos policromáticos micronucleados ( $n^{\circ}$ ) e a razão entre eritrócitos policromáticos e eritrócitos normocromáticos – PCE/NCE

Grupos Experimentais	Micronúcleos/ Frequência Média $\pm$ DP		PCE/NCE $\pm$ DP	
	Fêmeas	Machos	Fêmeas	Machos
Naive	2.80 $\pm$ 0.86	4.00 $\pm$ 0.63	0.59 $\pm$ 0.06	0.57 $\pm$ 0.06
Controle Positivo	18.60 $\pm$ 1.32*	21.00 $\pm$ 3.56*	0.19 $\pm$ 0.04*	0.20 $\pm$ 0.02*
EAES 125 mg/kg	3.60 $\pm$ 0.68	4.25 $\pm$ 0.48	0.62 $\pm$ 0.03	0.55 $\pm$ 0.06
EAES 250 mg/kg	3.60 $\pm$ 0.81	3.60 $\pm$ 0.68	0.59 $\pm$ 0.05	0.57 $\pm$ 0.10
EAES 500 mg/kg	3.80 $\pm$ 0.86	4.25 $\pm$ 1.93	0.55 $\pm$ 0.05	0.55 $\pm$ 0.16
EAES 1000 mg/kg	4.00 $\pm$ 0.55	4.60 $\pm$ 0.68	0.54 $\pm$ 0.03	0.58 $\pm$ 0.08

Naive – (água destilada filtrada + Tween80® via oral); Controle positivo - (Ciclofosfamida – 20mg/kg de peso., i.p.); Extrato Aquoso dos frutos da *E. serratus* 125 mg/kg, 250 mg/kg, 500 mg/kg, 1000 mg/kg –via oral. \*Diferenças estatísticas significativas ( $p < 0,05$ ); ANOVA/Tukey.

**Tabela 4-** Frequência de dano pelo ensaio cometa em ratos tratados via oral com o EAES

Grupos	Células Danificadas	Classes de dano				Score
		0	1	2	3	
<b>Fêmeas</b>						
Naive	4.60±0.68 <sup>a</sup>	95.40±0.63	4.00±0.45	0.60±0.40	0.00±0.00	5.20±1.02
Controle Positivo	66.80 ±1.56 <sup>b</sup>	33.20±1.68	34.00±2.02	28.00±1.51	4.80±1.24	104.40 ±3.94 <sup>a</sup>
EAES 125 mg/kg	7.20±0.80 <sup>a</sup>	92.80±0.91	6.00±0.77	1.00±0.55	0.20±0.20	8.60±1.50
EAES 250 mg/kg	8.20±1.07 <sup>a</sup>	91.80±1.07	5.60±0.87	1.60±0.68	1.00±0.63	11.80±2.22
EAES 500 mg/kg	6.80±1.16 <sup>a</sup>	93.20±1.16	3.40±1.08	1.20±0.97	2.20±0.91	12.40±2.97
EAES 1000 mg/kg	8.20±1.59 <sup>a</sup>	91.80±1.59	4.60±1.43	1.60±0.98	2.00±0.95	13.80±3.73
<b>Machos</b>						
Naive	6.20±0.58 <sup>a</sup>	93.80±0.58	5.60±0.40	0.60±0.40	0.00±0.00	6.80±0.91
Controle positivo	69.40 ±1.21 <sup>b</sup>	30.60±1.21	34.00±1.14	32.60±1.63	2.80±0.97	107.60 ±1.60 <sup>a</sup>
EAES 125 mg/kg	9.20±1.24 <sup>a</sup>	90.80±1.24	6.60±0.51	1.80±0.73	0.80±0.58	12.60±2.71
EAES 250 mg/kg	8.80±0.58 <sup>a</sup>	91.20±0.58	6.20±0.73	1.60±0.75	1.00±0.45	12.40±1.80
EAES 500 mg/kg	9.40±1.36 <sup>a</sup>	90.60±1.36	6.80±0.37	1.80±0.91	0.80±0.37	12.80±2.71
EAES 1000 mg/kg	9.80±0.86 <sup>a</sup>	90.20±0.86	6.00±0.45	3.00±1.14	0.80±0.37	14.40±2.04

Valores expressos em média± DP, n° 10 animais/grupo. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas significativas ( $p < 0.05$ ; ANOVA/Tukey).

a –Diferente significativamente do Naive e grupos tratados. Classe 0 – sem danos; classe 1 – cauda do cometa menor do que o diâmetro do nucleíode; classe 2 – cauda do cometa maior ou duas vezes maior do que o diâmetro do nucleíode; classe 3 – cauda do cometa maior do que o dobro do diâmetro do nucleíode.

Escore: tipo de dano x número de células com dano. Fonte: (Elaborado pela autora, 2020).

**Tabela 5.** Frequências de manchas mutantes observadas em asas de descendentes de *Drosophila melanogaster* do cruzamento padrão (ST) e de alta bioativação (HB) tratados com o extrato aquoso do fruto de *E. serratus*

Genótipos e Tratamento (mM)	N.º de ind.	Manchas por indivíduo (nº de manchas) diag. estatístico <sup>a</sup>				Total de manchas <i>mwh</i> <sup>c</sup>
		MSP	MSG	MG	TM	
		(1-2célis) <sup>b</sup> m=2	(>2célis) <sup>b</sup> m=5	m=5	m=2	
<i>mwh flr<sup>3</sup>/ ST</i>						
Controle Negativo	20	0.25 (05)	0.05 (01)	0.00 (00)	0.30 (06)	6
EAES [1,25]	20	0.10 (02) -	0.00 (00) i	0.00 (00) i	0.10 (02) -	2
EAES [2,5]	20	0.15 (03) i	0.05 (01) i	0.00 (00) i	0.20 (04) i	2
EAES [5,0]	20	0.15 (03) i	0.20 (04) i	0.00 (00) i	0.35 (07) i	7
<i>mwh flr<sup>3</sup>/ HB</i>						
Controle Negativo	20	0.30 (06)	0.20 (04)	0.00 (00)	0.50 (10)	10
EAES [1,25]	20	0.40 (08) i	0.15 (03) i	0.05 (01) i	0.60 (12) i	5
EAES [2,5]	20	0.20 (04) i	0.00 (00) -	0.00 (00) i	0.20 (08) -	4
EAES [5,0]	20	0.10 (02) -	0.70 (14) +	0.00 (00) i	0.80 (16) i	15

<sup>a</sup>Diagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würzler (1988): +, positivo; -, negativo; i, inconclusivo; m, fator de multiplicação para a avaliação de resultados significativamente negativos. <sup>b</sup>Incluindo manchas simples *flr3*raras; <sup>c</sup> Considerando os clones *mwh* para as manchas simples *mwh* e para as manchas gêmeas;

MSP = Manchas Simples Pequena; MSG = Manchas Simples Grande; MG = Manchas Gêmeas; TM = Total de Manchas  
Fonte: (Elaborada pela autora, 2020).

**Tabela 6.** Frequências de manchas mutantes observadas em asas de descendentes de *Drosophila melanogaster* do cruzamento padrão (ST) e de alta bioativação (HB) tratados com o extrato aquoso dos frutos de *E. serratus* associado à Doxorubicina

Genótipos e Tratamento (mg/mL)	N.º de Indivíduos	Manchas por indivíduo (nº de manchas) diag. estatístico <sup>a</sup>				Total de Manchas <i>mwh</i> <sup>c</sup>	Indução ↑ Redução ↓
		MSP (1-2cél)s <sup>b</sup> m=2	MSG (>2cél)s <sup>b</sup> m=5	MG m=5	TM m=2		
<i>mwh/flr<sup>3</sup>/ ST</i>							
Controle Negativo	20	0.25 (05)	0.05 (01)	0.00 (00)	0.30 (06)	6	
Controle Positivo DXR	20	0.50 (10) i	1.45 (29) +	0.65 (13) +	2.60 (52) +	48	
EAES [1,25] + DXR	20	0.90 (18) i	1.55 (31) -	0.60 (12) i	3.05 (61) -	54	17.30 % ↓
EAES [2,5] + DXR	20	1.70 (34) +	1.65 (33) -	1.00 (20) i	4.35 (87) +	69	67.30 % ↓
EAES [5,0] + DXR	20	0.30 (06) i	0.75 (15) +	0.50 (10) i	1.55 (31) +	24	94.20 % ↓
<i>mwh/flr<sup>3</sup>// HB</i>							
Controle Negativo	20	0.30 (06)	0.20 (04)	0.00 (00)	0.50 (10)	10	
Controle Positivo DXR	20	2.40 (48) +	2.55 (51) +	1.80 (36) +	6.75 (135) +	124	
EAES [1,25] + DXR	20	0.60 (12) +	1.35 (27) +	0.60 (12) +	2.55 (51) +	43	62.20% ↓
EAES [2,5] + DXR	20	1.10 (22) +	1.20 (24) +	0.90 (18) +	3.20 (64) +	54	52.50% ↓
EAES [5,0] + DXR	20	1.20 (24) +	1.85 (37) i	0.60 (12) +	3.65 (73) +	54	45.90% ↓

<sup>a</sup>Diagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würzler (1988): +, positivo; -, negativo; i, inconclusivo; m, fator de multiplicação para a avaliação de resultados significativamente negativos. <sup>b</sup>Incluindo manchas simples *flr3*raras; <sup>c</sup> Considerando os clones *mwh* para as manchas simples *mwh* e para as manchas gêmeas; MSP = Manchas Simples Pequena; MSG = Manchas Simples Grande; MG = Manchas Gêmeas; TM = Total de Mancha.

Fonte: (Elaborado pela autora, 2020).

## 6 CONCLUSÕES

- A DL50 do EAES é maior do que 2000mg/kg
- O EAES não é tóxico quando em exposição aguda
- Os frutos de *E. serratus* não possuem potencial genotóxico
- Os frutos de *E. serratus* não são considerados mutagênicos
- Os frutos de *E. serratus* detém de promissor potencial antimutagênico

**7 ANEXOS**

## PARECER DE APROVAÇÃO DO COMITÊ 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, 4 de abril de 2019.

#### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada **"Estudo da toxicidade aguda, subaguda, genotóxica, antígenotóxica e hepatoprotetora do extrato de *Elaeocarpus serratus in vitro e in vivo*"**, registrada sob o protocolo de nº 24/2018, sob a responsabilidade de Sílvia Aparecida Oesterreich e Mi Ye Marcaida Olimpio – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFGD) da Universidade Federal da Grande Dourados, em reunião de 14/09/2018. No dia 04/04/2019, houve alteração na espécie animal e prorrogação do mesmo, tornando o parecer com data do dia 07/12/2018 não válido. Passando a ter o número de protocolo 24/2018-02

Finalidade	( ) Ensino ( X ) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	10/12/2018 a 08/08/2019
Espécie/linhagem/raça	Rattus norvegicus
Nº de animais	130Wistar
Peso/idade	56 dias
Sexo	90 Machos 40 Fêmeas
Origem	Biotério Central UFGD

*Melissa Negrão Sepulveda*

Melissa Negrão Sepulveda  
Coordenadora CEUA