

FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E DESENVOLVIMENTO NA
REGIÃO CENTRO OESTE

YASMIN LANY VENTURA SAID

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS TÓXICO-REPRODUTIVOS, TERATOGENICOS
E GENOTÓXICOS DO EXTRATO ETANÓLICO DAS CASCAS DOS FRUTOS
DE *Campomanesia pubescens* EM CAMUNDONGOS**

Campo Grande/MS

2019

YASMIN LANY VENTURA SAID

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS TÓXICO-REPRODUTIVOS, TERATOGENICOS
E GENOTÓXICOS DO EXTRATO ETANÓLICO DAS CASCAS DOS FRUTOS
DE *Campomanesia pubescens* EM CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Saúde e
Desenvolvimento na Região Centro Oeste,
da Universidade Federal de Mato Grosso
do Sul, como requisito para obtenção do
título de mestre.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Andréia Conceição Milan Brochado Antoniolli Silva

Co-orientador: Rodrigo Juliano Oliveira

Campo Grande/MS

2019

YASMIN LANY VENTURA SAID

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS TÓXICO-REPRODUTIVOS, TERATOGENICOS
E GENOTÓXICOS DO EXTRATO ETANÓLICO DAS CASCAS DOS FRUTOS
DE *Campomanesia pubescens* EM CAMUNDONGOS**

Dissertação defendida em 23 de setembro de 2019

A banca examinadora, após avaliação do trabalho, atribuiu à aluna o conceito

Comissão Examinadora

Prof. Dra. Andreia Conceição Milan Brochado Antoniolli-Silva

Prof. Dra. Elisvania Freitas dos Santos

Prof. Dra. Mariana de Oliveira Mauro

Dr. Adrivanio Baranoski (suplente)

Agradecimentos

A Deus e Nossa Senhora por toda a força que Eles através das orações me deram, quando achava que não a tinha mais, por estarem comigo me ajudando a superar as dificuldades.

A Universidade Federal de Mato Grosso do Sul pela disponibilidade de laboratórios bem equipados, possibilitando a execução de pesquisas.

A minha orientadora Andreia Antonioli pela ajuda e correções. Obrigada!

Ao meu co-orientador Rodrigo Juliano Oliveira pela amizade, ajuda em todos os aspectos durante a execução do trabalho, disponibilidade e paciência em sanar minhas dúvidas, por todo o conhecimento passado a mim durante esse tempo de trabalho, pelo incentivo de melhorar sempre e não parar de buscar novos conhecimentos. Pelos conselhos, por me ajudar nas horas de desespero, passando segurança e a certeza de que as coisas irão bem. Muito obrigada!

A minha família mãe, vó e mana por me darem suporte nos dias de angústia e nervosismo, naqueles dias de muito trabalho em que estive ausente, por terem paciência comigo, quando tinha que passar o dia inteiro na faculdade ou no computador escrevendo o trabalho, por me ouvirem, se preocuparem com minha saúde e cansaço, por sempre estarem presentes sendo meu porto seguro nos momentos de alegria e tristeza. Amo vocês!

A Bruna pela parceria, por estarmos juntas nesses anos resolvendo problemas, compartilhando as dificuldades e principalmente as alegrias diárias da execução do trabalho e além do trabalho, da vida! Obrigada pela amizade.

Aos amigos do laboratório, Silvia, Juliana, Thais, Vivianne, Luane, Luana e demais membros do CeTroGen pela amizade de vários anos, pelo auxílio na execução dos ensaios, por serem aquela parte do dia de muita alegria e risadas que diversas vezes aliviaram o fardo do trabalho.

Aos profissionais da Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro Oeste (PPGSD), pela contribuição intelectual e disponibilidade em atender a demanda dos alunos do programa. E por fim, às agências financiadoras Fundect, Capes e CNPq pelo apoio financeiro desta pesquisa.

Resumo

Campomanesia pubescens é tradicionalmente utilizada pela medicina popular para o tratamento de desordens gastrointestinais e urinárias. Além disso, tem descrição de ação anti-inflamatória, ansiolítica, antidepressiva, antimicrobiana e antiproliferativa. Assim, o objetivo do estudo foi avaliar os efeitos toxico-reprodutivos, teratogênicos e genotóxicos do extrato etanólico das cascas dos frutos de *Campomanesia pubescens* (EECF Cp) em camundongos Swiss. Para isso, foi realizada a caracterização fitoquímica do extrato por meio de cromatografia de camada delgada comparativa e preparativa (CCDC e CCDP). Nos ensaios biológicos foram utilizados 30 camundongos fêmeas Swiss prenhes e 15 camundongos machos. Estes foram submetidos a cruzamento overnight, a prenhez foi detectada a partir da presença do plug vaginal e as fêmeas foram aleatoriamente distribuídas em três grupos experimentais (n=10): controle, EECFCp 100mg/kg e EECFCp 1000mg/kg. Os tratamentos aconteceram durante 18 dias do período gestacional e foram avaliados parâmetros biométricos, desempenho reprodutivo, desenvolvimento embriofetal, teratogenicidade e genotoxicidade pelo ensaio do micronúcleo. O estudo fitoquímico demonstrou que o EECFCp possui como principais constituintes as flavonas e chalconas. Nos ensaios biológicos observou-se que o EECFCp não alterou os parâmetros biométricos, desempenho reprodutivo, e o desenvolvimento embriofetal e, portanto, não é teratogênico. Além disso, não foi observada diferença estatisticamente significativa no ensaio do micronúcleo, indicando que o EECFCp não é genotóxico durante o período gestacional. Frente ao exposto, conclui-se que o EECFCp é seguro para o uso e consumo humano, inclusive durante o período gestacional. Esse fato reforça as características econômicas, nutricionais e farmacológicas dos frutos de *C. pubescens*.

Abstract

Campomanesia pubescens is traditionally used in folk medicine to the treatment of gastrointestinal and bladder disorders. In addition, is described to have anti-inflammatory, anxiolytic, antidepressant, antimicrobial and antiproliferation action. Therefore, the aim of the study is to evaluate the toxic-reproductive, teratogenic and genotoxic effects of ethanolic extract of *Campomanesia pubescens* fruits (EECF Cp) in Swiss mice. Were realized the phytochemical characterization of extract through CTLC and PTLC. In biological assays were used 30 female and 15 male mice. They were submitted to overnight mating, the pregnant females were detected by the presence of vaginal plug and randomly separated in the three following groups (n=10): control, EECF Cp 100 mg/kg and EECF Cp 1000 mg/kg. The treatment last 18 days of the gestational period and were evaluated the biometric parameters, reproductive performance, embryofetal development, teratogenicity and genotoxicity by micronucleus assay. The phytochemical study showed that EECF Cp has as principal component flavanones and chalcones. In biological assays were observed that EECF Cp did not cause alterations in biometric parameters, reproductive performance, embryofetal development and therefore is not teratogenic. In addition, was not observed statistically significant differences in micronucleus assay, so EECF Cp is not genotoxic during gestational period. In front of the above, EECF Cp do not cause variations in biometric parameters, reproductive performance, embryofetal development and DNA integrity, so is safe for human consumption, including in gestational period. This fact enhances the economic, nutritional and pharmacological characteristics *C. pubescens* fruits.

LISTA DE FIGURAS

Revisão de Literatura

Figura 1 - <i>Myrtus communis</i> , espécie tipo da família Myrtaceae.....	15
Figura 2 - <i>Campomanesia pubescens</i>	16
Figura 3 - Microscopia de fluorescência: (A) célula normal; (B) célula com micronúcleo; Microscopia de campo claro: (C) célula normal; (D) célula com micronúcleo.....	19

Manuscrito

Figura 1 - Delineamento experimental.....	32
Figura 2 - Linha do tempo dos tratamentos e tempos de coleta de cada ensaio. MN = micronúcleo.....	33
Figura 3 - Flavonona.....	36
Figura 4 - Chalcona.....	36
Figura 5 - Parâmetros biométricos de fêmeas tratadas com o extrato etanólico das cascas dos frutos de <i>C. pubescens</i> (EECF Cp).....	37
Figura 6 - Peso absoluto dos órgãos de fêmeas tratadas com o extrato etanólico das cascas dos frutos de <i>C. pubescens</i> (EECF Cp).....	37
Figura 7 - Peso relativo dos órgãos de fêmeas tratadas com o extrato etanólico das cascas dos frutos de <i>C. pubescens</i> (EECF Cp).....	38
Figura 8 - Frequência de micronúcleos encontrados em fêmeas tratadas com o extrato etanólico das cascas dos frutos de <i>C. pubescens</i> (EECF Cp).....	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Parâmetros reprodutivos de fêmeas tratadas com o extrato etanólico das cascas dos frutos de <i>C. pubescens</i> (EECF Cp).....	39
Tabela 2 - Malformações externas encontradas na prole de fêmeas tratadas com o extrato etanólico das cascas dos frutos de <i>C. pubescens</i> (EECF Cp).....	40
Tabela 3 - Malformações viscerais encontradas na prole de fêmeas tratadas com o extrato etanólico das cascas dos frutos de <i>C. pubescens</i> (EECF Cp).....	40
Tabela 4 - Malformações esqueléticas encontradas na prole de fêmeas tratadas com o extrato etanólico das cascas dos frutos de <i>C. pubescens</i> (EECF Cp).....	41

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Isolamento dos produtos do fracionamento da fração hexânica do extrato etanólico das cascas dos frutos de <i>C. pubescens</i> (EECF Cp).....	36
---	----

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	11
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	13
2.1 Plantas medicinais.....	13
2.2 Família Myrtaceae e gênero <i>Campomanesia</i>	14
2.2.1 <i>Campomanesia pubescens</i>	16
2.3 Toxicologia reprodutiva.....	17
2.4 Estudos pré-clínicos de avaliação de toxicidade reprodutiva.....	17
2.4.1 Ensaio de teratogenicidade.....	17
2.4.2 Ensaio de genotoxicidade.....	18
3. REFERÊNCIAS.....	20
4. OBJETIVOS.....	25
4.1 Objetivo geral.....	25
4.2 Objetivos específicos.....	25
5. MANUSCRITO.....	26
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	51
7. ANEXOS.....	52

1. INTRODUÇÃO

A utilização medicinal de plantas representa um conhecimento transmitido entre gerações e em escala global, representando recursos auxiliares na manutenção segura da saúde (TOMAZZONI; NEGRELLE; CENTA, 2006; COAN, MATIAS, 2014; EKOR, 2014), estendendo-se preocupação da utilização de forma segura em mulheres grávidas (ANVISA, 2010a; 2010b; FDA, 2018).

A partir da relação entre a estrutura química dos compostos presentes nas plantas medicinais e sua atividade no organismo, é possível compreender seus mecanismos de ação sistêmicos (PAZINATO et al., 2012). Embora muitas vezes o uso destes medicamentos seja feito sem respaldo científico, é possível que suas propriedades e efeitos sejam estabelecidos em ensaios pré-clínicos e clínicos, a fim de estabelecer a melhor forma de utilização (FRANÇA et al., 2008; SILVEIRA, BANDEIRA, ARRAIS, 2008; BRASIL, 2012).

O uso de plantas medicinais por gestantes, sem a orientação de um profissional da saúde, é uma preocupação aos médicos uma vez que há a possibilidade de o medicamento causar efeitos danosos ou até mesmo ser abortivo aos fetos (BRASIL, 2002). Segundo Rodrigues et al. (2011) há carência de dados e de confiabilidade a respeito da segurança do uso da maioria das plantas medicinais durante a gravidez, logo, a orientação para este grupo de pessoas é que não use qualquer tipo de medicamento sem conhecer sobre seus possíveis efeitos e segurança.

Entre as plantas utilizadas com base no conhecimento popular, estão as o gênero *Campomanesia* Ruiz & Pav, pertencentes à família Myrtaceae. Plantas deste gênero são comumente comercializadas por disporem de frutos saborosos, utilizados para a confecção de diversos tipos de doces e por apresentarem potencial uso terapêutico (KUSKOSKI et al., 2006; VALLILO et al., 2006b).

A espécie *Campomanesia pubescens* (*C. pubescens*) (D.C) O. Berg, conhecida popularmente como guavira ou gabioba (LORENZI et al., 2006), é utilizada na medicina popular pela ação comprovada no tratamento de distúrbios gastrointestinais e na bexiga (SILVA; RÉ-POPPI; CARDOSO, 2009). Também há relatos da ação antioxidante e anti-inflamatória do extrato das folhas desta espécie (CARDOSO et al., 2009; GUERRERO et al., 2010).

Estudos feitos por Silva, Ré-Poppi, Cardoso (2009) demonstraram que, a partir do óleo essencial dos frutos de *C. pubescens* foram encontrados 38 compostos nos quais, 7,9% eram monoterpenos e 89,5% sesquiterpenos.

O extrato etanólico dos frutos demonstrou ausência de toxicidade sistêmica e dose letal (DL₅₀) acima de 2000 mg/kg, indicando baixa toxicidade, nos tratamentos orais agudos e de curto prazo. Não apresentou efeitos genotóxicos, clastogênicos ou mutagênicos (SMART), no tratamento crônico e a partir de estudos comportamentais, observou-se efeito antidepressivo e ansiolítico para o extrato (VILLAS BOAS et al., 2018a,b,c). Frente ao exposto, considera-se que apesar da baixa toxicidade descrita para o EECFCp, a literatura não traz nenhum relato de segurança do uso durante o período gestacional.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Plantas medicinais

As plantas medicinais são conceituadas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária como “plantas ou suas partes, que contenham as substâncias, ou classes de substâncias, responsáveis pela ação terapêutica [...]” (ANVISA, 2010c). Portanto, são plantas que produzem substâncias químicas farmacologicamente ativas capazes de amenizar alguma irregularidade no organismo (COAN, MATIAS, 2014). O aproveitamento destas plantas, como forma de tratamentos terapêuticos, é feito desde a antiguidade e transmitido como conhecimento para as gerações seguintes (ARAÚJO et al., 2009; DE ALENCAR SILVA et al., 2017).

O conhecimento medicinal popular em comunidades, povos e grupos étnicos, simboliza por vezes o único recurso medicativo disponível para o tratamento e cura de enfermidades (MACIEL et al., 2002). É estimado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) que 80% da população mundial depende de fitoterápicos para os cuidados primários a saúde (OMS, 2013). Santos et al. (2012) e Lemos et al. (2015) afirmam que não se pode eliminar a questão cultural nos casos de saúde/doença, o conhecimento popular tem raízes em práticas milenares que devem atuar lado a lado com o modelo biomédico atual.

Vásquez, Mendonça e Noda (2014) verificaram que a maior utilização de plantas medicinais é para o tratamento das doenças mais frequentes, como dor de estômago, gripe, febre, tosse, dor de cabeça, gastrite, diarreia, entre outras. Vale ressaltar que o sustento de diversas famílias é retirado da comercialização dos mais diversos produtos medicinais em feiras, mercados populares (AMOROZO e GELY, 1988; PRANCE, 1992; MACIEL et al., 2002).

Nos últimos anos, houve intensificação dos estudos com plantas medicinais pela necessidade de mais conhecimentos relacionados a elas, a fim de explorar a composição química, posologia, mecanismos de ação, contraindicações, possíveis efeitos colaterais, precauções e garantir a segurança (DE MELO, RIBEIRO, STORPIRTIS, 2006; OLIVEIRA et al., 2015a).

O esclarecimento da população sobre tais temas é de suma importância para que haja correlação entre os saberes popular e científico, uma vez que essas frentes caminhando juntas como coadjuvantes, só tem a beneficiar e ampliar as contribuições

à saúde (FERRÃO et al., 2015). Nesse contexto, a manipulação, preparo e uso incorretos das plantas medicinais pode ocasionar efeitos adversos indesejáveis, como a toxicidade. Para evitar tais efeitos e garantir a segurança de utilização, deve-se dar importância ao preparo dos fitoterápicos, visto que estes somente apresentam efeito medicinal quando seguidos os parâmetros corretos de preparo e posologia. (JUNIOR, PINTO, MACIEL, 2005; CARNEIRO et al., 2014; FERRÃO et al., 2015).

Uma preocupação com estes efeitos negativos, é proveniente do uso por gestantes sem a orientação de um profissional da saúde, uma vez que há a possibilidade de o fitoterápico atravessar a barreira placentária, chegar ao feto e causar efeitos embriotóxicos, teratogênicos ou até mesmo ser abortivo (BRASIL, 2002). Segundo Rodrigues et al. (2011) há carência de dados e de confiabilidade a respeito da segurança do uso da maioria das plantas medicinais durante a gravidez, logo, a orientação para este grupo de pessoas é que não use qualquer tipo de medicamento sem conhecer sobre seus possíveis efeitos e segurança.

2.2. Família Myrtaceae e gênero *Campomanesia*

A família botânica Myrtaceae Juss. compreende mais de 5900 espécies agrupadas em aproximadamente 132 gêneros (CHRISTENHUSZ e BYNG, 2016) (Figura 1). São plantas arbóreas e arbustivas, reconhecidas pelo aroma que exalam as flores pela presença de óleos essenciais (WATSON e DALLWITZ, 1992; STEVENS, 2017).

Os óleos essenciais são metabólitos secundários produzidos pelas plantas, com composição variável de acordo com o grupo ao qual pertencem (OUSSALAH et al., 2007), mas os constituintes frequentemente encontrados são os monoterpenos, sesquiterpenos, fenilpropanoides e ésteres (CRAVEIRO e QUEIROZ, 1993; SOLÓRZANO-SANTOS; MIRANDANOVALES, 2012). São uma das matérias primas mais importantes para indústrias de perfumaria, alimentos e farmacêutica (CRAVEIRO e QUEIROZ, 1993).



Figura 1 - *Myrtus communis*, espécie tipo da família Myrtaceae. Fonte: Forest & Kim Starr, 2008.

Plantas do gênero *Campomanesia* Ruiz & Pav, são amplamente distribuídas no Cerrado brasileiro, ocorrendo também em outros países da América do Sul (LORENZI et al., 2006; VALLILO et al., 2006a; VALLILO et al., 2006b). Os frutos são comumente saborosos, adocicados e considerados importantes para a alimentação da fauna de pássaros, pequenos mamíferos, aves, répteis e pela população humana, *in natura* ou na forma de licores, geleias, sucos, sorvetes e doces (KUSKOSKI et al., 2006; VALLILO et al., 2006b).

O óleo essencial das folhas é rico em monoterpenos e sesquiterpenos, o do fruto possui grande quantidade de criptomeridiol, spatulenol e globulol (SILVA; CARDOSO; RE-POPPI, 2009; SILVA; RE-POPPI; CARDOSO, 2009). Segundo estudos realizados por Cardoso et al. (2009; 2010), o extrato hexânico das folhas possui ação antioxidante e antimicrobiana, não havendo confirmação da atividade gastroprotetora para esta espécie, diferindo de *Campomanesia xanthocarpa* e *Campomanesia lineatifolia* (MARKMAN; BACCHI; KATO, 2004; MADALOSSO et al., 2012).

Cardozo et al. (2018) concluíram após detalhada pesquisa, que algumas espécies do gênero *Campomanesia* apresentam efeitos antiulcerogênicos, antimicrobiano, anti-inflamatórios, antioxidante e antiproliferativo em modelos animais,

in vitro e em ensaios clínicos em humanos e, em adição, apresentam-se como potenciais opções para cuidados com distúrbios metabólicos associados a obesidade.

2.1.1. *Campomanesia pubescens*

A espécie *Campomanesia pubescens* (D.C) O. Berg, conhecida popularmente como guavira, gabioba peluda ou pilosa, é um arbusto com início de frutificação nos meses de novembro e dezembro. Quando jovens, os frutos apresentam-se em coloração verde e quando maduros, amarela (LORENZI et al., 2006) (Figura 2).



Figura 2 - *Campomanesia pubescens*. Fonte: Paulo James, 2012.

A espécie tem sido amplamente utilizada pela medicina popular para o tratamento de doenças gastrointestinais e na bexiga (SILVA; RÉ-POPPI; CARDOSO, 2009), mesmo com a escassez de estudos relacionados a ela. Por isso, faz-se necessária a busca por mais conhecimento sobre as propriedades de *Campomanesia pubescens*. Foram identificados 38 compostos a partir do óleo essencial das folhas (7,9% monoterpenos, 89,5% sesquiterpenos, 2,6% outros compostos), em outros estudos foram encontradas quercetinas e miricetinas, 34 componentes voláteis, flavonoides, chalconas, sesquiterpenos hidrocarbonetos e oxigenados, β sisterol, entre

outros (CARDOSO et al., 2009; SILVA; RÉ-POPPI; CARDOSO, 2009; CARDOSO et al., 2010).

Atualmente é conhecido que os extratos hexânico, hidroetanólico das folhas e etanólico dos frutos desta planta têm ação antiinflamatória, antiproliferativa frente a células de linhagens cancerígenas, antibactericida, antidepressiva, ansiolítica, não apresentou toxicidade para o microcrustáceo *Artrema salina*. Além destas propriedades, sabe-se ainda que apresentou baixa toxicidade aguda, crônica e de curta duração, ausência de alteração histopatológica, não foi mutagênico (SMART - somatic mutation and recombination test) ou genotóxico nas células de medula marrom (CARDOSO et al., 2009; CARDOSO et al., 2010; GUERRERO et al., 2010; CARDOSO et al., 2013; VILLAS BOAS et al., 2018a,b,c).

2.3. Toxicologia reprodutiva

A palavra teratologia vem do grego '*teras*' que significa monstro e '*logía*' estudo ('*teratología*', narração de fatos espantosos, relato de coisas monstruosas, estudo de monstruosidades), é o estudo das anomalias congênitas (PERSAUD, 1979). Denomina o desenvolvimento morfológico anormal e processos biológicos que causam malformações durante o período de organogênese da gestação.

Por muitos anos e em diversas localizações, o nascimento de crianças malformadas era ligado a castigos divinos ou a pecados cometidos pelos pais, sendo os pais e o filho condenados à morte. Após a década de 1930 começaram as especulações sobre a possibilidade de fatores externos intervirem no aparecimento de malformações. Neste contexto iniciaram-se as especulações experimentais sobre malformações congênitas e sua origem (HALE, 1935; MANSON, 1986), pode-se dizer que são recentes estas investigações científicas.

2.4. Estudos pré-clínicos de avaliação de toxicidade reprodutiva

2.4.1. Ensaio de teratogenicidade

Um agente teratogênico pode ser definido como qualquer substância, organismo ou agente físico que, estando presente durante a vida embrionária ou fetal, é capaz de produzir alguma alteração estrutural ou funcional na prole (DICKE, 1989).

A ação danosa de um teratógeno depende do estágio de (I) desenvolvimento em que se encontra o feto – dependendo do momento em que se encontra a gestação, o contato pode ser mais ou menos danoso ou letal - , (II) a relação entre dose e efeito - dose, taxa de passagem placentária, distribuição fetal do agente - , (III) genótipo materno fetal - diferenças genéticas podem conferir suscetibilidade ou resistência - (WILSON, 1977; SCHULER-FACCINI et al., 2011).

Conhecendo o acima explicado, é possível inferir que a finalidade de um estudo de teratogênese é detectar agentes teratógenos e, para isso, a utilização de modelos animais de experimentação é a melhor maneira de prevenir uma possível ação teratogênica, a fim de tomar uma posição preventiva e conhecer o problema antes que ele venha a acometer parcela da população (SCHULER-FACCINI et al., 2011).

2.4.2. Ensaios de genotoxicidade

“A toxicologia é a ciência que estuda os efeitos nocivos decorrentes das interações das substâncias químicas com o organismo, com a finalidade de prevenir, diagnosticar e tratar a intoxicação [...]” (CHASIN; LIMA, 2010). A toxicidade, por sua vez, é a capacidade de um agente tóxico provocar efeitos indesejados ou até nocivos a organismos (RUPPENTHAL, 2013).

Danos genéticos ocasionam uma etapa crucial para o processo de carcinogênese, uma vez que provocam instabilidade genética, causando mutações no DNA. Essas alterações podem ocorrer espontaneamente ou induzidas pela ação de agentes tóxicos (TORRES-BUGARÍN et al., 2015), os quais podem ser agentes químicos, físicos, produtos alimentícios endógenos naturais ou resultar de processamentos de alimentos (BJELDANES, SHIBAMOTO, 2014).

Um dos ensaios utilizados para avaliar a presença de danos cromossômicos espontâneos ou induzidos, é o ensaio do micronúcleo. Este detecta erros ocorridos em qualquer momento da divisão celular que são claramente observados na anáfase, quando há a separação dos cromossomos homólogos para polos opostos da célula. Neste momento nota-se a formação de fragmentos acêntricos ou até mesmo cromossomos inteiros, que segregam atrasados por problemas relacionados as fibras do fuso (AGOSTINI, 1993).

Quando a célula segue com a divisão celular, passando para a fase da telófase, os fragmentos resultantes da quebra são incluídos nas células filhas, formando um

núcleo menor ao lado do núcleo principal, gerando os micronúcleos. A detecção deste erro é de fácil visualização pela equivalência com o núcleo principal em coloração, forma e conteúdo de material genético (AGOSTINI, 1993).

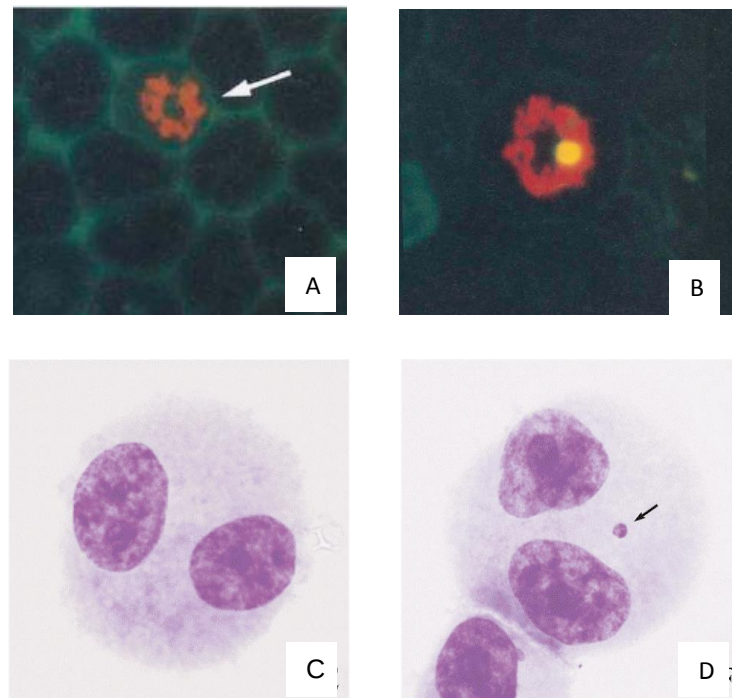


Figura 3 - Microscopia de fluorescência: (A) célula normal; (B) célula com micronúcleo; Microscopia de campo claro: (C) célula normal; (D) célula com micronúcleo. Fonte A e B: Hayashi et al., 1990; Fonte C e D: Roberto et al., 2016.

O teste do micronúcleo é considerado biomarcador de danos, pois pode detectar quebras cromossômicas, ausência de centrômero (efeito clastogênico) ou erros no funcionamento do fuso mitótico (mecanismo aneugênico) (KASHYAP, REDDY, 2012). Em todos os casos, o material genético foi perdido, não podendo ser incorporado naturalmente a célula filha recém-formada (SCHMID, 1975; AGOSTINI, 1993). A presença de grande quantidade de micronúcleos indica dano genotóxico ao material genético, ou seja, um dano fixado que não pode mais ser reparado, já que os mecanismos pelos quais o micronúcleo é causado são irreversíveis (HEDDLE et al., 1991).

3. REFERÊNCIAS

- AGOSTINI, Jeanete Maristela S. O teste do micronúcleo: seu uso no Homem. **Biotemas**, v. 6, n. 2, p. 1-19, 1993.
- AMOROZO, M. C. M., GELY, A. Uso de Plantas Medicinais por Caboclos do Baixo Amazonas; Barcarena: PA; **Museu Paraense Emílio Goeldi**, 1988, 4, p. 47.
- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Consulta Pública nº 116**, de 23 de dezembro de 2010a. Acesso em: 11 jul. 2018. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/33836/350888/116.pdf/b9adb5e9-362b-4e65-832e-1338bfe12e92?version=1.0>>.
- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia para a condução de estudos não clínicos de segurança necessários ao desenvolvimento de medicamentos**. Brasília, 2010b.
- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução - Rdc Nº 10**, de 9 de Março de 2010. Dispõe sobre a notificação de drogas vegetais junto à Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e dá outras providências, 2010c.
- ARAÚJO, A. C.; SILVA, J. P.; CUNHA, J. L. X. L.; ARAÚJO, J. L. O. Caracterização socioeconômico-cultural de raizeiros e procedimentos pós-colheita de plantas medicinais comercializadas em Maceió, AL. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.11, n.1, p.81-91, 2009.
- BJELDANES, L. F., SHIBAMOTO, T. Introdução à Toxicologia de Alimentos. **Elsevier Brasil**, 2014.
- BRASIL. Resolução SES nº1757. Contra-indica o uso de Plantas Medicinais no Âmbito do Estado do Rio de Janeiro e dá outras providências. Diário Oficial do Estado do Rio de Janeiro, 20 fev. 2002, v.27, n.33. Parte I.
- BRASIL. **Práticas integrativas e complementares: plantas medicinais e fitoterapia na atenção básica**. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica, 2012.
- CARDOSO, C. A. L., SILVA, J. R. M., KATAOKA, V. M. F., BRUM, C. S., POPPI, N. R. Avaliação da atividade antioxidante, toxicidade e composição química por CG-EM do extrato hexânico das folhas de *Campomanesia pubescens*. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 29, n. 3, p. 297-301, 2009.
- CARDOSO, C. A. L., SALMAZZO, G. R., HONDA, N. K., PRATES, C. B., VIEIRA, M. D. C., COELHO, R. G. Antimicrobial activity of the extracts and fractions of hexanic fruits of *Campomanesia* species (Myrtaceae). **Journal of medicinal food**, v. 13, n. 5, p. 1273-1276, 2010.
- CARDOSO, C. A. L., SALVADOR, M. J., CARVALHO, J. E., CARVALHO, R. G. Avaliação das atividades antiproliferativa e antioxidante em frutos de *Campomanesia pubescens*. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 72, n. 4, p. 309-315, 2013.

CARDOZO, C., INADA, A., MARCELINO, G., FIGUEIREDO, P., ARAKAKI, D., HIANE, P., FREITAS, K. Therapeutic Potential of Brazilian Cerrado *Campomanesia* Species on Metabolic Dysfunctions. **Molecules**, v. 23, n. 9, p. 2336, 2018.

CARNEIRO, F. M., SILVA, M. J. P. D., BORGES, L. L., ALBERNAZ, L. C., COSTA, J. D. P. Tendências dos estudos com plantas medicinais no Brasil. **Revista Sapiência: sociedade, saberes e práticas educacionais**, v. 3, n. 2, p. 44-75, 2014.

CHASIN, A.A.M., LIMA, I.V. Toxicologia para químicos. Minicursos CRQ-IV, 2010.

CHRISTENHUSZ, M. J., BYNG, J. W. The number of known plants species in the world and its annual increase. **Phytotaxa**, v. 261, n. 3, p. 201-217, 2016.

COAN, C. M., MATIAS, T. A utilização das plantas medicinais pela comunidade indígena de Ventarra Alta-RS. **SaBios-Revista de Saúde e Biologia**, v. 9, n. 1, p. 11-19, 2014.

CRAVEIRO, A. A., QUEIROZ, D. C. Óleos essenciais e química fina. **Química nova**, v. 16, n. 3, p. 224-228, 1993.

DE ALENCAR SILVA, A., LEMOS, I. C. S., PETRÔNIO, E., FERNANDES, G. P. OS AGENTES DA CURA NA MEDICINA RÚSTICA BRASILEIRA. **Revista Interdisciplinar de Estudos em Saúde**, v. 6, n. 1, p. 72-84, 2017.

DE MELO, D. O., RIBEIRO, E., STORPIRTIS, S. A importância e a história dos estudos de utilização de medicamentos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 4, 2006.

DICKE, Jeffrey M. Teratology: principles and practice. **Medical Clinics of North America**, v. 73, n. 3, p. 567-582, 1989.

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

FDA - Food and Drug Administration. **Medicine and pregnancy**. 2018. Acesso em: 11 jul. 2018. Disponível em: <<https://www.fda.gov/ForConsumers/ByAudience/ForWomen/ucm118567.htm>>.

FERRÃO, B. H., DE MEDEIROS ABRANTES, V., TEIXEIRAL, M. B., BMM, C. V., BATISTA, E. O., DE OLIVEIRA, H. B. Toxicologia das plantas medicinais: um grande risco para a população mundial. **Anais simpac**, v. 2, n. 1, 2015.

FRANÇA, I. X. L.; SOUZA, J. A.; BAPTISTA, R. S.; BRITTO, V. R. S. Medicina popular: benefícios e malefícios das plantas medicinais. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v. 61, n. 2, 2008.

GUERRERO, F. M. G., ZIMMERMAN, L. R., CARDOSO, E. V., DE LIMA, C. C., PERDOMO, R. T., ALVA, R., GUERRERO, A. T. Investigação da Toxicidade Crônica das Folhas de Guavira (*Campomanesia pubescens*) em Ratos Machos. **Revista Fitos Eletrônica**, v. 5, n. 02, p. 64-72, 2010.

HALE, F. The relation of vitamin A to anophthalmos in pigs. **American Journal of Ophthalmology**, v. 18, n. 12, p. 1087-1093, 1935.

HEDDLE, J. A., CIMINO, M. C., HAYASHI, M., ROMAGNA, F., SHELBY, M. D., TUCKER, J. D., MACGREGOR, J. T. Micronuclei as an index of cytogenetic damage: past, present, and future. **Environmental and molecular mutagenesis**, v. 18, n. 4, p. 277-291, 1991.

JUNIOR, V. F. V., PINTO, A. C., MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura. **Química nova**, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.

KASHYAP, B., REDDY, P. S. Micronuclei assay of exfoliated oral buccal cells: means to assess the nuclear abnormalities in different diseases. **Journal of Cancer Research and Therapeutics**, v. 8, n. 2, p. 184, 2012.

KUSKOSKI, E. M., ASUERO, A. G., MORALES, M. T., FETT, R. Wild fruits and pulps of frozen fruits: antioxidant activity, polyphenols and anthocyanins. **Ciência Rural**, v. 36, n. 4, p. 1283-1287, 2006.

LEMONS, I. C. S., DE ANDRADE ARAÚJO, M., DE MENEZES, I. R. A., FERNANDES, G. P. Uso de plantas medicinais para o tratamento de feridas. **Revista Interdisciplinar**, v. 8, n. 2, p. 60-67, 2015.

LORENZI, Harri. **Frutas brasileiras e exóticas cultivadas**: de consumo in natura. Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2006.

MACIEL, M. A. M., PINTO, A. C., VEIGA, J. V., GRYNBERG, N. F., ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

MADALOSSO, R. C., OLIVEIRA, G. C., MARTINS, M. T., VIEIRA, A. E. D., BARBOSA, J., CALIARI, M. V., TAGLIATI, C. A. *Campomanesia lineatifolia* Ruiz & Pav. as a gastroprotective agent. **Journal of ethnopharmacology**, v. 139, n. 3, p. 772-779, 2012.

MANSON, J. M. Mechanism of nitrofen teratogenesis. **Environmental health perspectives**, v. 70, p. 137-147, 1986.

MARKMAN, B. E. O.; BACCHI, E. M.; KATO, E. T. M. Antiulcerogenic effects of *Campomanesia xanthocarpa*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 94, n. 1, p. 55-57, 2004.

OLIVEIRA, F. A., CONDE, B. E., GOMES, F. T., FONSECA, A. S., CAMPOS, B. C. Potencial de cura e segurança do uso de plantas medicinais na utilização do método da biodigital como tratamento alternativo no grupo de medicina alternativa em Juiz de Fora, MG. **Biológicas & Saúde**, v. 5, n. 17, 2015a.

OMS - Organização Mundial de Saúde, 2013. Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2014 - 2023. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/95008/1/9789243506098_spa.pdf> Acesso em: 05 Fev. 2019.

OUSSALAH, M., CAILLET, S., SAUCIER, L., LACROIX, M. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: E. coli O157:

H7, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. **Food control**, v. 18, n. 5, p. 414-420, 2007.

PAZINATO, M. S., BRAIBANTE, H. T., BRAIBANTE, M. E., TREVISAN, M. C., SILVA, G. S. Uma abordagem diferenciada para o ensino de funções orgânicas através da temática medicamentos. **Química Nova na escola**, v. 34, n. 1, p. 21-25, 2012.

PERSAUD, T. V. N. Reproductive and teratological studies with prostaglandins. In: **Teratological testing**. Springer, Dordrecht, p. 161-177, 1979.

PRANCE, G. T. **Out of the Amazon**; HMSO: London, 1992, p. 83

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

RUPPENTHAL, J. E. Toxicologia. Universidade Federal de Santa Maria, Colégio Técnico Industrial de Santa Maria; **Rede e-Tec Brasil**, 2013.

SANTOS, A. C. B. D.; SILVA, A. F. D.; SAMPAIO, D. L.; SENA, L. X. D.; GOMES, V. R.; LIMA, V. L. D. A. Antropologia da saúde e da doença: contribuições para a construção de novas práticas em saúde. **Revista do NUFEN**, v.4, n.2, 11-21, 2012.

SCHMID, W. The micronucleus test, **Mutation Research**, v. 31, p. 9-15, 1975.

SCHULER-FACCINI, L., SANSAVERINO, M. T., ABEICHE, A. M., VIANNA, F. S., SILVA, A. A. Manual de teratogênese em humanos. Rio de Janeiro: FEBRASGO, 2011.

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

SILVA, J. R., CARDOSO, C. A., RE-POPPI, N. Essential oil composition of the leaves of *Campomanesia pubescens*. **Chemistry of natural compounds**, v. 45, n. 4, p. 565, 2009.

SILVEIRA, P. D., BANDEIRA, M. A. M., ARRAIS, P. S. D. Farmacovigilância e reações adversas às plantas medicinais e fitoterápicos: uma realidade. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 4, p. 618-626, 2008.

SOLÓRZANO-SANTOS, F., MIRANDA-NOVALES, M. G. Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 23, n. 2, p. 136-141, 2012.

STEVENS, P. F., 2017. Angiosperm Phylogeny Website. Version 14, July 2017 [continuously updated since 2001]. Myrtaceae en APGWeb. Disponível em: <<http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>>. Acesso em 19 de Dezembro de 2018.

TOMAZZONI, M. I., BONATO NEGRELLE, R. R., CENTA, M. L. Fitoterapia popular: a busca instrumental enquanto prática terapêutica. **Texto & Contexto Enfermagem**, v. 15, n. 1, 2006.

TORRES-BUGARÍN, O.; MACRIZ ROMERO, N.; RAMOS IBARRA, M.L.; FLORES-GARCÍA, A.; VALDEZ ABURTO, P.; ZAVALA-CERNA, M.G. Genotoxic Effect in Autoimmune Diseases Evaluated by the Micronucleus Test Assay: Our Experience and Literature Review. **BioMed research international**. 2015:194031, 2015.

VALLILO, M. I.; BUSTILLOS, O. V.; Aguiar, O. T. D. de. Identificação de terpenos no óleo essencial dos frutos de *Campomanesia adamantium* (Cambessédes) O. Berg-Myrtaceae. **Revista do Instituto Florestal**, v. 18, n. 1, p. 15-22, 2006a.

VALLILO, M. I.; LAMARDO, L. C. A.; GABERLOTTI, M. L.; OLIVEIRA, E. D.; MORENO, P. R. H. Composição química dos frutos de *Campomanesia adamantium* (Cambessédes) O. Berg. **Ciência e tecnologia de alimentos**, v. 26, n. 4, p. 725-955, 2006b.

VÁSQUEZ, S. P. F., MENDONÇA, M. D., & NODA, S. D. N. Etnobotânica de plantas medicinais em comunidades ribeirinhas do Município de Manacapuru, Amazonas, Brasil. **Acta Amazonica**, v. 44, n. 4, p. 457-472, 2014.

VILLAS BOAS, G. R., DE ARAÚJO, F. H. S., MARCELINO, J. M., CASTRO, L. H. A., DA SILVEIRA, A. P. S., NACER, R. S., OESTERREICH, S. A. Preclinical safety evaluation of the ethanolic extract from *Campomanesia pubescens* (Mart. ex DC.) O. BERG (guavira) fruits: analysis of genotoxicity and clastogenic effects. **Food & Function**, 2018a.

VILLAS BOAS, G. R., DOS SANTOS, A. C., SOUZA, R. I. C., DE ARAÚJO, F. H. S., TRAESEL, G. K., MARCELINO, J. M., OESTERREICH, S. A. Preclinical safety evaluation of the ethanolic extract from guavira fruits (*Campomanesia pubescens* (DC) O. BERG) in experimental models of acute and short-term toxicity in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 118, p. 1-12, 2018b.

VILLAS BOAS, G. R., STEFANELLO DA SILVEIRA, A. P., FEITOSA FARINELLI, B. C., LIMA CARDOSO, C. A., ARCE, E., OESTERREICH, S. A. The ethanolic extract obtained from *Campomanesia pubescens* (DC) O. BERG fruits exerts anxiolytic and antidepressant effects on chronic mild stress model and on anxiety models in Wistar rats: Behavioral evidences. **Nutritional neuroscience**, p. 1-11, 2018c.

WATSON, L., DALLWITZ, M.J. The families of flowering plants: descriptions, illustrations, identification and information retrieval. <http://biodiversity.uno.edu/delta.htm>, 1992.

WILSON, James G. **Current status of teratology**. In: General Principles and Etiology. Springer, Boston, MA, 1977. p. 47-74.

4. OBJETIVOS

4.2. Objetivo geral

Avaliar os efeitos tóxico-reprodutivos, teratogênicos e genotóxicos do extrato etanólico das cascas dos frutos de *Campomanesia pubescens* (EECFCp) em camundongos *Swiss*.

4.3. Objetivos específicos

Avaliar os efeitos do EECFCp nos parâmetros biométricos e pesos de órgãos de camundongos *Swiss* fêmeas;

Avaliar os efeitos do EECFCp nos parâmetros reprodutivos, por meio avaliações de desempenho reprodutivo em camundongos *Swiss* prenhes;

Avaliar os efeitos do EECFCp no desenvolvimento embriofetal, por meio de ensaios de teratogenicidade na prole de camundongos *Swiss* fêmeas;

Avaliar os efeitos genotóxicos do EECFCp em fêmeas *Swiss*, por meio do ensaio do micronúcleo.

5. MANUSCRITO

O extrato etanólico das cascas dos frutos de *Campomanesia pubescens* não altera o desempenho reprodutivo, o desenvolvimento embriofetal e não é genotóxico

Artigo submetido à Journal of Ethnopharmacology

O extrato etanólico das cascas dos frutos de *Campomanesia pubescens* não altera o desempenho reprodutivo, o desenvolvimento embrionário e não é genotóxico

Yasmin Lany Ventura Said^{a,b}, Bruna Brandão Beal^{a,b}, Silvia Cordeiro das Neves^{a,b}, Juliana Miron Vani^{a,b}, Antonio Carlos Duenhas Monreal^c, Cláudia Andréa Lima Cardoso^d, Cândida Aparecida Leite Kassuya^e, Rodrigo Juliano Oliveira^{a,b,f,g}, Andréia Conceição Milan Brochado Antoniolli-Silva^{a,b}

^a Centro de Estudos em Células Tronco, Terapia Celular e Genética Toxicológica (CeTroGen), Hospital Universitário Maria Aparecida Pedrossian (HUMAP), Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil.

^b Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento da Região Centro-Oeste, Faculdade de Medicina Dr. Hélio Mandetta (FAMED), Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil.

^c Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Alimentos e Nutrição (FACFAN), Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil.

^d Centro de Estudos em Recursos Naturais, Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul (UEMS), Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil

^e Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), Dourados, MS, Brasil.

^f Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Alimentos e Nutrição (FACFAN), Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil.

^g Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular, Centro de Ciências Biológicas (CCB), Universidade Estadual de Londrina (UEL), Londrina, Paraná, Brasil.

Resumo

Relevância etnofarmacológica: *Campomansia pubescens* é tradicionalmente utilizada pela medicina popular para o tratamento de distúrbios gastrointestinais e urinários. Além disso, tem descrição de ação anti-inflamatória, ansiolítica, antidepressiva, antimicrobiana e antiproliferativa.

Objetivo do estudo: Avaliar os efeitos toxico-reprodutivos, teratogênicos e genotóxicos do extrato etanólico das cascas dos frutos de *Campomanesia pubescens* (EECF Cp) em camundongos Swiss.

Material e métodos: Foi realizada a caracterização fitoquímica do extrato por meio de cromatografia de camada delgada comparativa e preparativa (CCDC e CCDP). Nos ensaios biológicos foram utilizados 30 camundongos fêmeas Swiss prenhes, distribuídas aleatoriamente em três grupos experimentais (n=10) – controle, EECFCp 100mg/kg e EECFCp 1000mg/kg. Os tratamentos aconteceram durante 18 dias do período gestacional. Foram avaliados parâmetros biométricos, desempenho reprodutivo, desenvolvimento embrionário, teratogenicidade e ensaios de genética toxicológica.

Resultados: O estudo fitoquímico demonstrou que o EECFCp possui como principais constituintes as flavonas e chalconas. O EECFCp não alterou os parâmetros biométricos, desempenho reprodutivo, e o desenvolvimento embrionário e, portanto, não é teratogênico. Além disso, verificou-se que o EECFCp não é genotóxico durante o período gestacional.

Conclusão: O EECFCp é seguro para o uso e consumo humano, inclusive durante o período gestacional. Esse fato reforça as características econômicas, nutricionais e farmacológicas dos frutos de *C. pubescens*.

Palavras-chave: Teratogênese, Toxicidade, Planta medicinal, Guavira, Malformações

1. INTRODUÇÃO

Entre as plantas utilizadas com base no conhecimento popular, estão as do gênero *Campomanesia* Ruiz & Pav, pertencentes à família Myrtaceae (BERG, 1858; DE LIMA et al., 2017). Plantas deste gênero são comumente comercializadas por disporem de frutos saborosos e utilizados na produção de doces (VALLILO et al., 2006; DE LIMA et al., 2017) e por apresentarem potencial terapêutico para redução do estresse oxidativo (VIECILI et al., 2014; CAMPOS, 2018), colesterol sanguíneo, eficácia em processos inflamatórios, disfunção endotelial (VIECILI et al., 2014), ulcerações gástricas (MARKMAN, BACCHI, KATO, 2004), diarreia, reumatismo (LORENZI et al., 2006), entre outros.

A espécie *Campomanesia pubescens* (*C. pubescens*) (D.C) O. Berg, conhecida popularmente como guavira ou gabirola (LORENZI et al., 2006), é utilizada na medicina popular por atuar no tratamento de distúrbios gastrointestinais e na bexiga (SILVA; RÉ-POPPI; CARDOSO, 2009). Além disso, a literatura descreve atividade no tratamento de diarreia, redução das taxas de colesterol circulante (BALLVE, 1995), reumatismo, desentupimento hepático, proliferação microbiana no trato urinário (CAMPOS et al., 2012). Também há relatos da ação antioxidante (CARDOSO et al., 2009), anti-inflamatória (GUERRERO et al., 2010) e depurativa (BALLVE, 1995).

Estudos feitos por Silva, Ré-Poppi, Cardoso (2009) demonstraram que o óleo essencial dos frutos de *C. pubescens* possuem 38 compostos dos quais 7,9% são monoterpenos e 89,5% sesquiterpenos. Esse mesmo óleo apresentou atividade biológica antibacteriana, tendo potencial aplicação terapêutica na prevenção de doenças bucais (ROCHA, 2011). Já em relação ao extrato etanólico das cascas dos frutos de *C. pubescens* (EECF Cp), observou-se alto teor de flavonoides na composição (VILLAS BOAS et al., 2018a, 2018b, 2018c). Além disso, o EECF Cp não apresentou efeitos genotóxicos, clastogênicos ou mutagênicos avaliados por meio do teste de SMART (VILLAS BOAS et al., 2018a). EECF Cp não apresentou toxicidade sistêmica e a dose letal (DL₅₀) foi estabelecida como superior a 2000 mg/kg, o que indica baixa toxicidade nos tratamentos orais agudos e de curto prazo (VILLAS BOAS et al., 2018b). Em modelo animal de estudos comportamentais de tratamento crônico, o EECF Cp apresentou efeito antidepressivo e ansiolítico (VILLAS BOAS et al., 2018c).

Frente ao exposto, considera-se que apesar da baixa toxicidade descrita para o EECFCp, a literatura não traz nenhum relato de segurança do uso durante o período gestacional. Assim, a presente pesquisa teve por objetivo avaliar os efeitos toxico-reprodutivos, teratogênicos e genotóxicos do EECFCp em camundongos Swiss.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal e obtenção do extrato etanólico das cascas dos frutos de *C. pubescens* (EECFCp)

Os frutos de *C. pubescens* foram coletados em outubro de 2015 em Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil, e uma exsicata (registro 839) foi depositada no Herbário da Universidade Federal da Grande Dourados, Mato Grosso do Sul, Dourados, MS, Brasil. Essa mesma coleta tem número SISGEN A910DC7. Após a coleta, as cascas dos frutos *in natura* (1000g), previamente triturados, foram macerados com 2L de etanol por 7 dias. Após filtração a borra resultante foi novamente extraída com 2L de etanol, também por 7 dias e este processo se repetiu por mais duas vezes consecutivas. A união das frações líquidas obtidas após rotaevaporação resultou em 299,98g de extrato etanólico.

2.1.1 Estudo de caracterização fitoquímica

2.1.1.1 Quantificação de flavonoides

A solução do EECFCp (concentração de 500µg/mL em etanol) foi avaliada em relação aos teores de flavonoides empregando o método descrito por Lin e Tang (2007). Os resultados foram expressos em mg de equivalentes de quercetina por mL do extrato.

Fenóis foram dosados com a mesma amostra utilizada na quantificação de flavonoides e foi empregado o método descrito por Djeridane et al. (2006). Os resultados foram expressos em mg de equivalentes de ácido gálico por mL de extrato.

2.1.1.2 Fracionamento do extrato

O extrato etanólico (5,15g) foi dissolvido em água:metanol (4:1 v/v) e submetidos a partições com solventes orgânicos (hexano e acetato de etila). A fração

hexânica do extrato foi fracionada em coluna cromatográfica empregando sílica-gel (0,063-0,200 mm, Merck), em sistema solvente gradiente (hexano e acetato de etila) e as 69 frações obtidas foram analisadas por cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC, Macherey-Nagel) e hexano:acetato de etila 90:10 v/v na eluição. As frações 33-57 foram reunidas e submetidas à purificação empregando cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP) com placas de 20x20 cm em sílica gel e a eluição foi realizada utilizando hexano:acetato de etila 80:20 v/v, obtendo-se duas amostras (F-1, 1,2 mg, F-2, 1,5 mg, F-3, 2,3 mg). A fração acetato de etila foi fracionada em coluna cromatográfica empregando sílica-gel (0,063-0,200 mm, Merck) em sistema solvente gradiente hexano:acetato de etila (70:30 v/v), hexano:acetato de etila (5:5 v/v) (2), acetato de etila (3) e etanol, resultando em uma fração para cada sistema solvente.

As frações foram analisadas por CCDC e as frações denominadas 1 e 2, foram submetidas ao fracionamento por CCDP. As eluições das frações 1 e 2 foram realizadas utilizando hexano:acetato de etila 7:3 v/v. Da fração 1, obteve-se 2mg de um sólido (F-4); fração 2, obteve-se 1,8mg (F-5). As substâncias foram identificadas empregando-se análises espectroscópicas (RMN ^1H , ^{13}C e RMN 2D). Os dados obtidos foram comparados com os descritos na literatura (BYRNE et al., 1982; AGRAWAL, 1989; SRIVASTAVA, SHAW, KULSHRESHTHA, 1995; SOLLADIÉ, GEHROLD, MAIGNAN, 1999; MUSTAFA, PERRY, WEAVERS, 2005).

2.2 Animais e condições experimentais

Foram utilizados 45 camundongos (*Mus musculus*) da linhagem Swiss de ambos os sexos em idade reprodutiva, sendo 30 fêmeas com peso médio de 35g e 15 machos com peso médio de 40g. Todos os animais passaram por período de adaptação de 7 dias e foram alocados em mini-isoladores (Rack ventilada Alesco®), forrados com maravalha de *Pinus sp.* Os machos foram mantidos isoladamente e as fêmeas em trios por mini-isolador. Os animais foram alimentados com ração comercial padrão (Nuvital®) e água filtrada sob sistema de livre acesso. A luz foi controlada por fotoperíodo (12h claro/ 12h escuro) e a temperatura mantida em $22 \pm 2^\circ\text{C}$ e umidade de 55 ± 10 . A pesquisa foi realizada de acordo com os protocolos da Declaração Universal dos Direitos Animais e aprovada pela Comissão de Ética no Uso

de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), sob o parecer número 965/2018.

2.3 Delineamento Experimental

Os animais foram acasalados *overnight* na proporção de 2 fêmeas: 1 macho. A detecção da prenhez foi realizada por meio da observação do *plug* vaginal, sendo este considerado o dia zero de gestação (OLIVEIRA et al., 2009; Gonçalves et al., 2013, 2014; DE DAVID et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2015b; ISHIKAWA et al., 2018; VANI et al., 2018a). Os animais prenhes foram distribuídos aleatoriamente entre os grupos experimentais (n=10): Controle - os animais receberam o veículo do EECFCp na proporção de 0,1mL/10g de peso corpóreo (p.c.), por via oral (v.o.), do 1º ao 18º dia gestacional (d.g.); Grupo EECFCp 100 - os animais receberam o EECFCp na dose de 100mg/kg (p.c., v.o.), do 1º ao 18º d.g; Grupo EECFCp 1000 - os animais receberam o EECFCp na dose de 1000mg/kg (p.c., v.o.), do 1º ao 18º d.g (Figura 1).

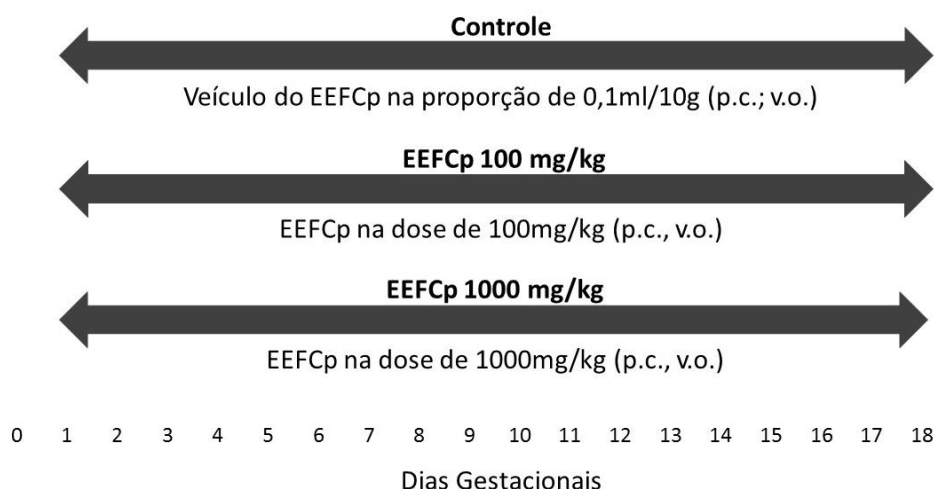


Figura 1 - Delineamento experimental.

A dose de 100 mg/kg foi escolhida a partir de um estudo piloto e da dose efetiva descrita para *C. xanthocarpa* (DA SILVA et al., 2016), do mesmo gênero. A partir desta dose, foi definida a dose 10x maior do que aquela que tem a atividade desejada, seguindo a recomendação dos guidelines da área (ANVISA, 2010; OECD 423, 2001).

2.4 Ensaios biológicos

Coletou-se sangue periférico por meio de punção da veia caudal no 16º, 17º e 18º d.g. No 18º d.g. os animais foram submetidos à eutanásia por deslocamento cervical seguida de laparotomia, histerectomia e onfalectomia para a coleta, pesagem e devido armazenamento dos órgãos (pulmão, coração, baço, fígado, rins, placenta) e fetos (Figura 2).



Figura 2 - Linha do tempo do tratamento e tempos de coleta de cada ensaio. MN = micronúcleo.

Os fetos coletados foram pesados e passaram por análise sistemática de malformações externas e sexagem. Em seguida, foram distribuídos aleatoriamente em dois subgrupos, cada um com 50% da ninhada. Os fetos do primeiro grupo foram fixados em solução de Bodian's (água destilada (142 mL), ácido acético (50 mL), formaldeído (50 mL) e álcool 95% (758 mL)) por pelo menos sete dias e destinados à análise visceral (VANI et al., 2018b) por meio de microdissecção com cortes estratégicos, para o estudo de tórax e abdômen, propostos por Barrow e Taylor (1969), e para estudo da cabeça segundo Wilson (1965), com alterações propostas por Oliveira et al. (2005), Damasceno et al. (2008) e Oliveira et al. (2009). A classificação das alterações viscerais foi baseada nos trabalhos de Taylor (1986), Manson e Kang (1994), Wise et al. (1997), Damasceno et al. (2008) e Oliveira et al. (2009). Os fetos do segundo subgrupo foram fixados em acetona absoluta por pelo menos sete dias e destinados à análise esquelética, pela técnica descrita por Staples e Schnell (1964) e modificada por Oliveira et al. (2009). Após a fixação em acetona absoluta, os fetos foram eviscerados e mergulhados em solução de KOH (0,8%) para

o processo de diafanização. Em seguida, foram adicionadas quatro gotas de Alizarina Red. Esta solução foi trocada a cada 24 horas durante quatro dias consecutivos. Depois dos fetos corados, a solução de KOH foi substituída pela solução clareadora (1 litro de glicerina : 1 litro de álcool etílico : 0,5 litros de álcool benzílico) e trocada a cada 24 horas, durante cinco dias. As classificações das malformações foram baseadas nos estudos de Taylor (1986), Manson et al. (1994), Wise et al. (1997), Damasceno et al. (2008) e Oliveira et al. (2009).

As análises de vísceras e esqueletos fetais foram realizadas em lupa estereomicroscópica (Nikon® – SMZ 745T) com aumento de 4 vezes.

2.4.1 Parâmetros biométricos

Os cálculos de parâmetros biométricos foram feitos a partir dos dados de peso inicial (fêmeas pesadas no dia zero), peso final (fêmeas pesadas no 18º d.g.), ganho de peso (peso final - peso inicial), peso do útero e ganho de peso líquido (ganho de peso - peso do útero), além dos dados de pesos absolutos e relativos dos órgãos: coração, pulmão, baço, rins e fígado.

2.4.2 Desempenho reprodutivo e desenvolvimento embriofetal

Foram quantificados e/ou calculados os parâmetros reprodutivos relativos ao número de implantes (n° de fetos vivos + n° de reabsorções), número de fetos vivos; viabilidade fetal (n° de fetos vivos $\times 100$ / n° de implantes), taxa de perdas pós implantacionais ($(n^{\circ}$ de implantes - n° de fetos vivos) $\times 100$ / n° de implantes), número de reabsorção, taxa de reabsorção (n° de reabsorções $\times 100$ / n° de implantes), peso placentário, peso fetal, índice placentário (peso placentário / peso fetal), razão sexual (n° de fetos machos $\times 100$ / n° de fetos fêmeas).

A classificação do peso fetal segundo a idade gestacional (CPFIG) foi feita de duas formas, (I) segundo Soulimane-Mokhtari et al. (2005), sendo os fetos considerados adequados para idade gestacional (AIG), quando apresentarem peso corporal até 1,7 desvio padrão em relação à média dos fetos do grupo controle; considerados pequenos para a idade gestacional (PIG), quando apresentarem peso corporal menor que 1,7 desvios padrão em relação à média dos fetos do grupo controle; considerados grandes para a idade gestacional (GIG), quando apresentarem

peso corporal maior que 1,7 desvios padrão em relação à média do grupo controle; e (II) segundo Oliveira et al. (2009) os fetos foram classificados como fetos com peso adequado para a idade da prenhez (PAIP) quando o peso do feto estava compreendido entre média de peso dos fetos do grupo controle mais ou menos o desvio padrão; fetos com baixo peso para a idade de prenhez (BPIP) quando o peso do feto é inferior à média de peso dos fetos do grupo controle menos o desvio padrão deste mesmo grupo; fetos com elevado peso para a idade de prenhez (EPIP) quando o peso do feto é superior à média do peso dos fetos do grupo controle mais o desvio padrão deste mesmo grupo. Soulimane-Mokhtari et al. (2005) classifica os pesos dos fetos individualmente e Oliveira et al. (2009) classifica a ninhada de forma geral.

2.4.3 Micronúcleo em sangue periférico

A técnica utilizada para o desenvolvimento do ensaio foi baseada na proposta de Carvalho et al. (2015). Por punção da veia caudal, foram coletados no 16º, 17º e 18º d.g 20µL de sangue periférico e depositados em uma lâmina previamente corada com Alaranjado de Acridina (1mg/mL) e, em seguida, recoberta por lamínula. O material permaneceu armazenado em freezer (-20°C) por um período mínimo de sete dias e foi avaliado em microscópio de fluorescência (Zeiss®) no aumento de 400x, com filtro de excitação 420-490nm e filtro de barreira 520nm. Foram analisadas 2000 células/lâmina/tempo, totalizando 6000 por animal.

2.5 Análise estatística

Foi utilizado o teste ANOVA/Tukey para dados paramétricos, o teste Kruskal-Wallis/Dunn para dados não paramétricos e o teste do Qui-quadrado para comparações de frequências entre os grupos. Os dados foram apresentados em média $\pm$ erro padrão da média e o nível de significância estabelecido foi de $p < 0,05$.

3. RESULTADOS

3.1. Estudo fitoquímico

O extrato apresentou $78,13 \pm 0,3$ mg/g de flavonoides (Figura 3) e $198,77 \pm 0,9$ mg/g de compostos fenólicos (médias de triplicata), como as chalconas (Figura 4).

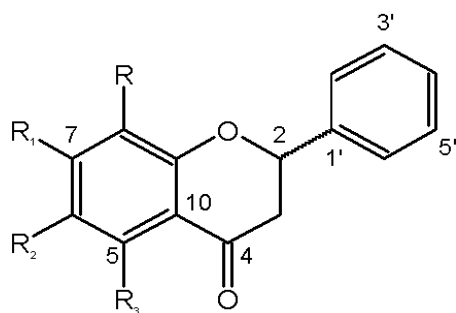


Figura 3 - Flavonona.

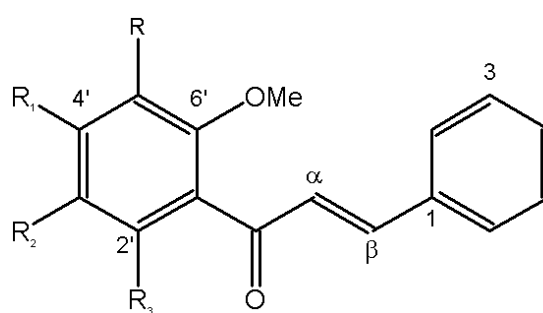


Figura 4 - Chalcona.

3.1.1. Fracionamento do extrato

O fracionamento da fração hexânica resultou no isolamento das frações: 2-hidroxi-3'-metil-4',6'-dimetoxichalcona1 (F1), 7-hidroxi-5-metoxi-6-metilflavanona (F2) e 5-hidroxi-7-metoxi-8-metilflavanona (F3). Posteriormente, o fracionamento cromatográfico da fração acetato de etila do EECFCp, conduziu ao isolamento de 2',4'-dihidroxi-3',5'-dimetil-6'-metoxichalcona (F4) 2',4'-dihidroxi-5'-metil-6'-metoxichalcona (F5) (Quadro 1).

Quadro 1 - Isolamento dos produtos do fracionamento da fração hexânica do extrato etanólico das cascas dos frutos de *C. pubescens* (EECF Cp).

Frações	Radicais			
	R	R ₁	R ₂	R ₃
F1	H	OH	CH ₃	OCH ₃
F2	CH ₃	OCH ₃	H	OH
F3	H	OCH ₃	CH ₃	OH
F4	CH ₃	OH	H	OH
F5	CH ₃	OH	CH ₃	OH

3.2. Ensaios Biológicos

3.2.1. Parâmetros biométricos

Os animais iniciaram o experimento com pesos semelhantes ($p > 0,05$) e o tratamento com o EECFCp não alterou o peso final, ganho de peso, o peso do útero, o ganho de peso líquido (Figura 5) e nem o peso absoluto (Figura 6) e relativo (Figura 7) do coração, pulmão, baço, fígado e rins.

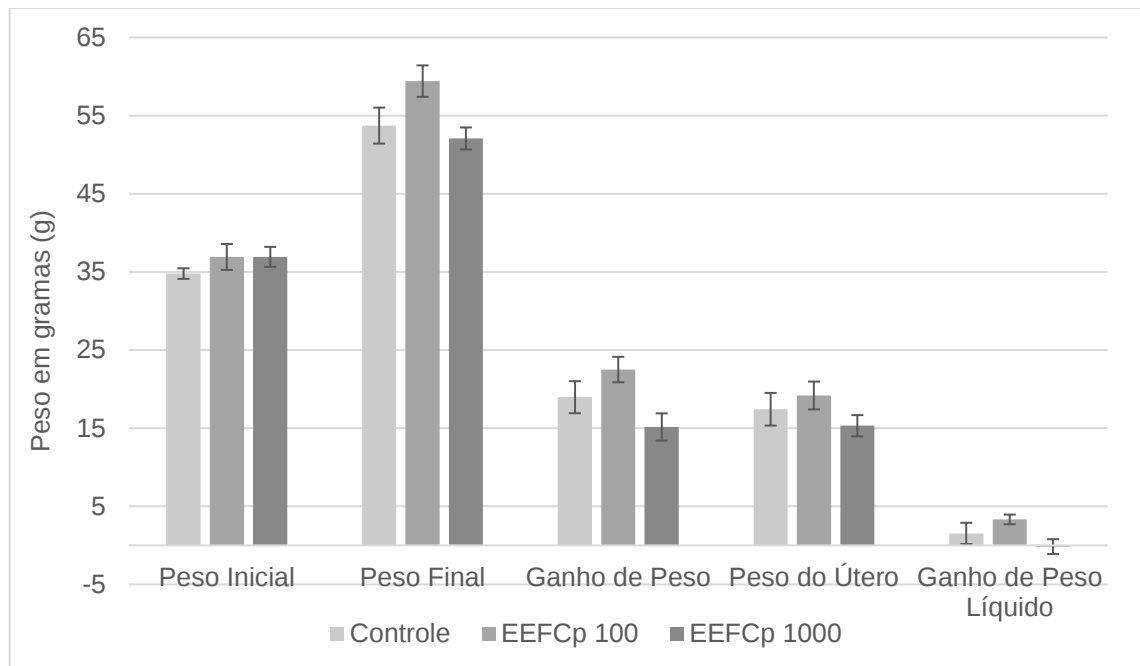


Figura 5 - Parâmetros biométricos de fêmeas tratadas com o extrato etanólico das cascas dos frutos de *C. pubescens* (EEFCp). Teste estatístico: ANOVA/Tukey ($p > 0,05$).

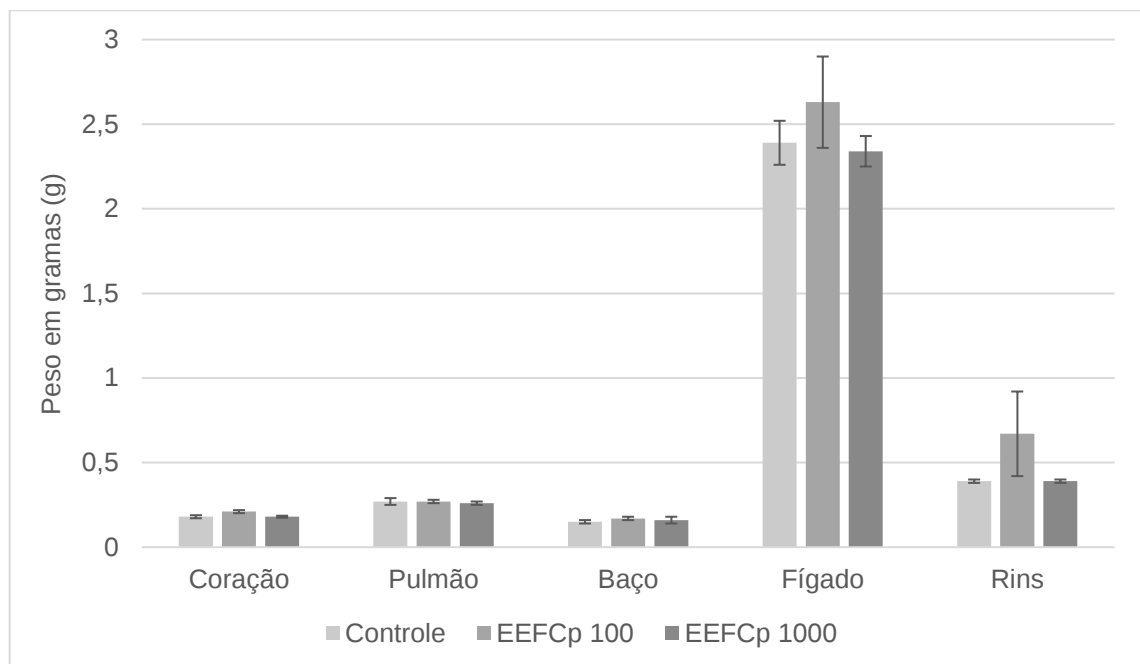


Figura 6 - Peso absoluto dos órgãos de fêmeas tratadas com o extrato etanólico das cascas dos frutos de *C. pubescens* (EEFCp). Teste estatístico: ANOVA/Tukey ($p > 0,05$).

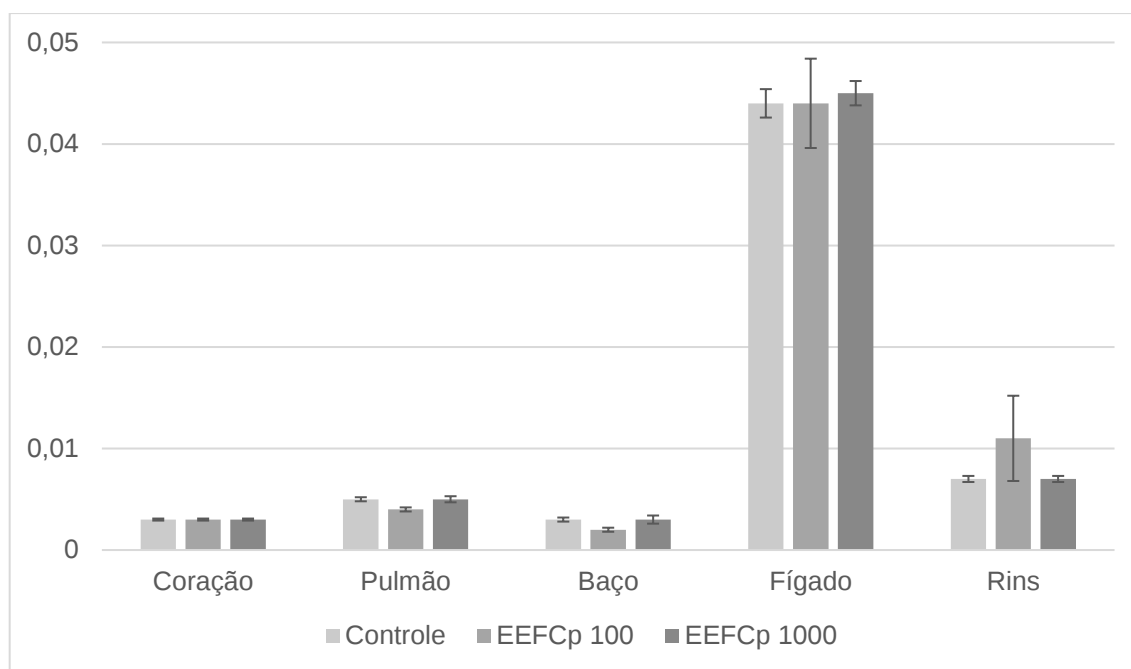


Figura 7 - Peso relativo dos órgãos de fêmeas tratadas com o extrato etanólico das cascas dos frutos de *C. pubescens* (EECFCp). Teste estatístico: ANOVA/Tukey ($p>0,05$).

3.2.2. Desempenho reprodutivo

O EECFCp não alterou o número de implantes, de reabsorções e de fetos vivos; e nem a viabilidade fetal, a taxa de perdas pós-implantacionais, reabsorção, a taxa de reabsorção e a razão sexual ($p>0,05$). Entretanto, observou-se aumento ($p<0,05$) do peso placentário para o grupo EECFCp 100; redução do peso fetal ($p<0,05$) em EECFCp 100 e EECFCp 1000 e aumento do índice placentário ($p<0,05$) para os mesmos grupos experimentais (Tabela 2).

3.2.3. Desenvolvimento embriofetal

Em relação à classificação do peso à idade gestacional de acordo com a metodologia proposta por Soulimane-Mokhtari et al. (2005), verificou-se que o tratamento com EECFCp em ambas doses não alterou o peso dos fetos quando observados individualmente ($p>0,05$), uma vez que a porcentagem de fetos com peso adequado para a idade gestacional (AIG) foi maior que as porcentagens de fetos pequenos e grandes para a idade gestacional (PIG e GIG), em ambos grupos tratados com o EECFCp. Usando a adequação do peso à idade gestacional proposta por Oliveira et al. (2009) verificou-se que as proles tratadas como EECFCp foram classificadas com baixo peso para a idade de prenhez (BPIP) (Tabela 1).

Tabela 1 - Parâmetros reprodutivos de fêmeas tratadas com o extrato etanólico das cascas dos frutos de *C. pubescens* (EECF Cp).

Parâmetros	Grupos Experimentais		
	Controle	EECF Cp 100	EECF Cp 1000
Implantes ¹	12,4 ± 1,44 ^a	13,6 ± 1,38 ^a	12,8 ± 1,14 ^a
Fetos Vivos ¹	11,0 ± 1,28 ^a	12,7 ± 1,18 ^a	10,2 ± 1,13 ^a
Viabilidade Fetal ¹	90,90 ± 4,77 ^a	94,36 ± 1,88 ^a	81,46 ± 6,35 ^a
TPPI ¹	9,1 ± 4,77 ^a	5,64 ± 2,07 ^a	18,54 ± 6,35 ^a
Reabsorção ¹	1,4 ± 0,80 ^a	0,9 ± 0,35 ^a	2,5 ± 1,30 ^a
Taxa de Reabsorção ¹	9,1 ± 4,77 ^a	5,64 ± 2,07 ^a	17,95 ± 6,88 ^a
Peso Placentário (g) ²	0,07 ± 0,002 ^a	0,09 ± 0,002 ^b	0,08 ± 0,002 ^a
Peso Fetal (g) ²	1,23 ± 0,01 ^a	1,19 ± 0,01 ^b	1,14 ± 0,01 ^c
CPFID - Soulimane-Mokhtari			
%PIG ³	10,00	3,94	6,8
%AIG ³	88,18	95,27	92,2
%GIG ³	1,82	0,79	1,00
APIP - Oliveira			
		BPIP	BPIP
Índice Placentário ²	0,06 ± 0,002 ^a	0,08 ± 0,002 ^b	0,07 ± 0,002 ^b
Razão Sexual ¹	121,92 ± 21,82 ^a	236,61 ± 89,97 ^a	104,03 ± 25,91 ^a

Legenda: TPPI - taxa de perdas pós-implantacionais. CPFID (Soulimane-Mokhtari et al., 2005) - classificação do peso fetal segundo a idade gestacional; %PIG - porcentagem de fetos pequenos para a idade gestacional; %AIG - porcentagem de fetos adequados para a idade gestacional; GIG - porcentagem de fetos grandes para a idade gestacional; APIP (Oliveira et al., 2009) - adequação do peso a idade de prenhez; BPIP = fetos com baixo peso para a idade de prenhez (Teste estatístico: ¹ANOVA/Tukey; ²Kruskal-Wallis/Dunn - Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas; ³Teste de qui-quadrado, p<0,05).

As malformações externas encontradas foram hematoma, retroversão anterior unilateral, posterior unilateral e posterior bilateral, escoliose, gastrosquise, cauda em vírgula e hidropsia. A análise percentual da frequência dessas malformações mostrou que houve redução (p<0,05) no número de retroversões e caudas em vírgula, em ambos grupos tratados com EECFCp quando comparados ao grupo controle. As demais malformações encontradas não apresentaram diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle (p>0,05) (Tabela 2).

Tabela 2 - Malformações externas encontradas na prole de fêmeas tratadas com o extrato etanólico das cascas dos frutos de *C. pubescens* (EECF Cp).

Tipos de Malformação	Grupos Experimentais					
	Controle		EEFCp 100		EEFCp 1000	
Linhagens analisadas (N)	10		10		10	
Fetos analisados (N)	Malformações Externas					
	110		127		102	
	NA	%	NA	%	NA	%
Hematoma	0	0,00	1	0,78	1	0,98
Retroversão anterior unilateral	0	0,00	3	2,36	0	0,00
Retroversão posterior unilateral	18	16,36	0*	0,00	2*	1,96
Retroversão posterior bilateral	2	1,82	1	0,78	2	1,96
Retroversão total	20	18,18	4*	3,15	4*	3,92
Escoliose	2	1,82	1	0,78	2	1,96
Gastrosquise	0	0,00	1	0,78	0	0,00
Cauda em vírgula	13	11,82	3*	2,36	3*	2,94
Hidropsia	1	0,90	0	0,00	1	0,98

Legenda: NA = número absoluto de fetos com malformação; % = porcentagem dos fetos com malformação. *Diferença estatisticamente significativa (Teste estatístico: Qui-quadrado; $p < 0,05$).

As malformações viscerais encontradas foram hidrocefalia (em graus leve e moderado), hiperplasia de coana, aurícula reduzida, hidronefrose (em graus leve, moderado e grave), micronefria e bexiga dilatada. As malformações tiveram ocorrências semelhantes em todos os grupos experimentais ($p > 0,05$) (Tabela 3).

Tabela 3 - Malformações viscerais encontradas na prole de fêmeas tratadas com o extrato etanólico das cascas dos frutos de *C. pubescens* (EECF Cp).

Malformações	Grupos experimentais					
	Controle		EECF Cp 100		EECF Cp 1000	
Linhagens analisadas (N)	10		10		10	
Fetos analisados (N)	Malformações viscerais					
	58		57		51	
	NA	%	NA	%	NA	%
Hidrocefalia leve	11	18,96	18	31,58	13	25,49
Hidrocefalia moderada	1	1,72	2	3,51	5	9,80
Hidrocefalia total	12	20,69	20	35,09	18	35,29
Hiperplasia de coana	13	22,41	8	14,03	6	11,76
Aurícula reduzida	2	3,45	3	5,26	0	0,00
Hidronefrose leve	6	10,34	5	8,77	3	5,88
Hidronefrose moderada	1	1,72	1	1,75	0	0,00
Hidronefrose grave	0	0,00	1	1,75	0	0,00
Hidronefrose total	7	12,07	7	12,28	3	5,88
Micronefria	0	0,00	3	5,26	0	0,00
Bexiga dilatada	1	1,72	0	0,00	0	0,00

Legenda: NA - número absoluto; % - porcentagem (Teste estatístico: Qui-quadrado; $p > 0,05$).

Quanto às malformações esqueléticas, nenhuma apresentou diferença estatisticamente significativa, quando comparados os grupos tratados com o EECFCp e o grupo controle ($p>0,05$). As malformações encontradas foram (I) ossificação reduzida do vômer, palato, presfenoide, nasal, interparietal, supraparietal, parietal, frontal, manúbrio, centro esternal e processo xifoide; (II) ausência de manúbrio, centro esternal, processo xifoide; (III) ossificação irregular do centro esternal, processo xifoide; e (IV) redução unilateral da 7ª costela (Tabela 4).

Tabela 4 - Malformações esqueléticas encontradas na prole de fêmeas tratadas com o extrato etanólico das cascas dos frutos de *C. pubescens* (EECFCp).

Malformação	Grupos experimentais					
	Controle		EECFCp 100		EECFCp 1000	
Linhagens analisadas (N)	10		10		10	
Fetos analisados (N)	Malformações esqueléticas					
	51		61		46	
	NA	%	NA	%	NA	%
OR Vômer	43	84,31	56	91,80	43	93,48
OR Palato	42	82,35	56	91,80	43	93,48
OR Presfenoide	39	76,47	50	81,97	42	91,30
OR Nasal	21	41,18	25	40,98	17	36,96
OR Interparietal	0	0,00	1	1,64	0	0,00
OR Supraparietal	0	0,00	1	1,64	0	0,00
OR Parietal	0	0,00	1	1,64	0	0,00
OR Frontal	0	0,00	1	1,64	0	0,00
OR Manúbrio	0	0,00	1	1,64	1	2,17
A Manúbrio	0	0,00	0	0,00	1	2,17
OI Centro Estial	0	0,00	0	0,00	1	2,17
OR Centro Estial	3	5,88	6	9,84	3	6,52
A Centro Estial	0	0,00	1	1,64	0	0,00
OI Processo Xifoide	0	0,00	4	6,56	0	0,00
OR Processo Xifoide	1	1,96	4	6,56	6	13,04
A Processo Xifoide	0	0,00	2	3,28	0	0,00
R 7ª Costela	0	0,00	1	1,64	1	2,17

Legenda: NA - número absoluto; % - porcentagem; OR - ossificação reduzida; OI - ossificação irregular; A - ausente; R - redução (Teste estatístico: Qui-quadrado; $p>0,05$).

3.2.4. Micronúcleo em sangue periférico

O EECFCp não é genotóxico visto que não aumentou ($p>0,05$) a frequência de micronúcleos avaliados nos 3 últimos dias experimentais. A frequência média dos diferentes grupos experimentais variou de $3,0\pm0,45$ a $4,1\pm0,58$ (Figura 8).

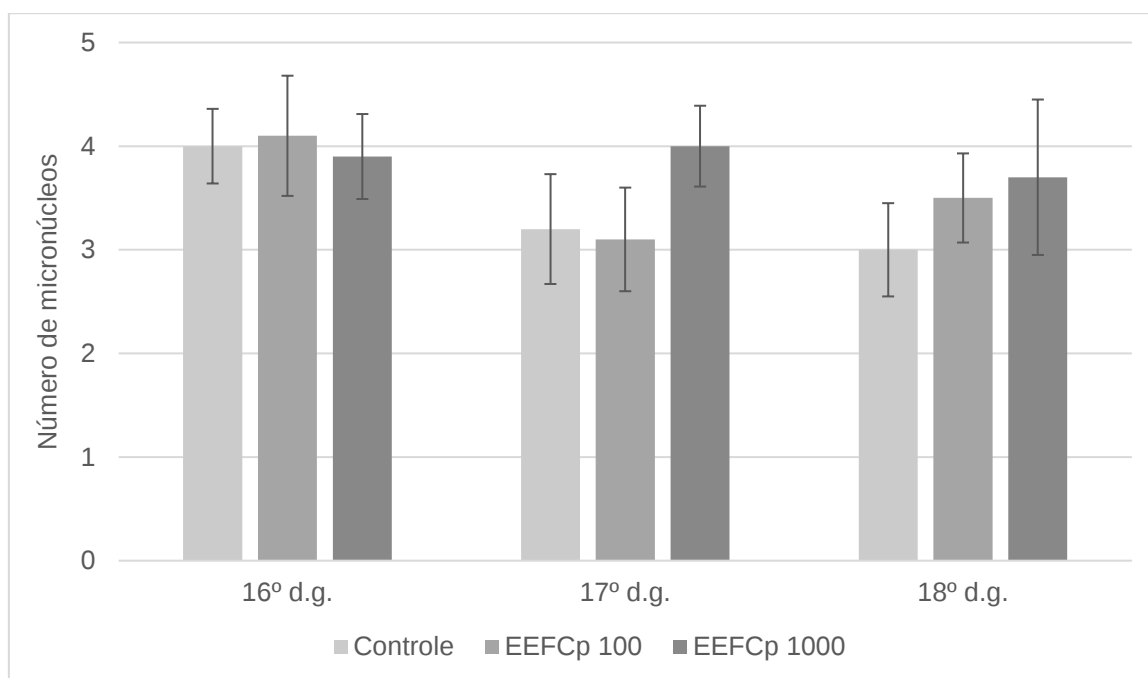


Figura 8 - Frequência de micronúcleos encontrados em fêmeas tratadas com o extrato etanólico das cascas dos frutos de *C. pubescens* (EEFCp). Teste estatístico: ANOVA/Tukey ($p>0,05$).

4. DISCUSSÃO

A literatura pesquisada indica que há carência de estudos que envolvem segurança toxicogenética e reprodutiva, e teratogênica dos extratos do gênero *Campomanesia*, em específico da casca dos frutos da espécie *C. pubescens*.

O tratamento com o EECFCp não causou alteração dos parâmetros biométricos e nem variações significativas no peso absoluto e relativo de órgãos. Estudos relatam que a perda de peso pode ser considerada um importante indicativo de toxicidade aguda (SAAD et al., 2002; GAO et al., 2019; GEBREHIWOT et al., 2019) bem como variações, em especial, no peso relativo dos órgãos (GAO et al., 2019). Outros estudos específicos de toxicologia reprodutiva e teratogenicidade também fazem uso desses parâmetros e inferem ausência de toxicidade quando não há significativas perdas de peso e variações nos pesos dos órgãos (DAMASCENO et al.,

2002; COSTA-SILVA et al., 2007; COELHO, 2010; DE DAVID et al., 2014; GONÇALVES et al., 2014; ISHIKAWA et al., 2018; e VANI et al., 2018a, 2018b).

O tratamento com o EECFCp não alterou o número de implantes, de fetos vivos, de reabsorção e nem a viabilidade fetal, a taxa de perdas pós-implantacionais, a taxa de reabsorção e a razão sexual. Logo, o EECFCp não alterou o desempenho reprodutivo das fêmeas de acordo com o presente delineamento. Resultados semelhantes foram observados para *C. xanthocarpa* em modelo de ratos *Wistar* (AUHAREK et al., 2013). No entanto, os dados são inéditos para a espécie *C. pubescens*. Além disso, esse estudo é pioneiro também em demonstrar que essa espécie não altera o desenvolvimento embriofetal visto que a frequência de malformações externas, viscerais e esquelética não diferiram entre o grupo controle e os tratados com EECFCp. As malformações observadas ocorreram de forma semelhante tanto no grupo controle quando nos tratados com o EECFCp ou até mesmo em menores frequências nos grupos tratados com o EECFCp. Diante do exposto, essas malformações são consideradas variantes de normalidade e infere-se segurança para o uso do EECFCp inclusive durante o período gestacional.

A ocorrência de variantes da normalidade é comum e relatada em diferentes trabalhos da área tais como nos estudos de De David et al. (2014), que estudou o extrato etanólico da casca de *Gochnatia polymorpha* ssp. *floccosa*; Gonçalves et al. (2014) que estudou a fração hidrometanólica do extrato das folhas de *Annona nutans*; Oliveira et al. (2015b) que estudou os compostos 6-DMAP e CHX; Pessatto et al. (2017) que estudou as frações butanólica e diclorometano do extrato de *Gochnatia polymorpha* ssp. *floccosa*; Ishikawa et al. (2018), que estudou o extrato etanólico das folhas de *Doliocarpus dentatus*; de Vani et al. (2018a), que estudou o larvicida Temefós; de Vani et al. (2018b) que usou o líquido natural da casca da castanha de caju e óleo de mamona (TaLCC-20). Destaca-se ainda que segundo Taylor (1986) e Oliveira et al. (2009) variantes da normalidade, como é o caso de hidrocefalias e hidronefroses de grau moderado-leve; redução de ossificação dentre outras; regrediriam com a continuidade da gestação, logo não são consideradas com alta relevância biológica e para a vitalidade e desenvolvimento do organismo.

Além disso, observou-se aumento do índice placentário em associação com a redução do peso fetal. Observou-se também aumento do peso placentário nos animais tratados apenas com a dose de 100mg/kg. Esses dados em isolados não são

suficientes para indicar alteração no desenvolvimento embriofetal visto que não houve alteração nos parâmetros reprodutivos e nem a ocorrência de malformação. No entanto, a hipertrofia placentária acontece, em geral, associada ao aumento do índice placentário e redução do feto fetal. Nesses casos há uma tentativa do organismo materno em suprir as necessidades de nutrientes e oxigênio do feto (GICHANGI, NYONGO, TEMMERMAN, 1993) e essas condições adversas são comuns quando a mãe é exposta a xenobióticos que alteram o desempenho reprodutivo e o desenvolvimento embriofetal (OLIVEIRA et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2015a; MAHABADY et al., 2016; RENGASAMY, 2017).

As análises de classificação do peso fetal utilizadas neste estudo permitem observar (I) o crescimento dos fetos individualmente (Soulimane-Mokhtari et al., 2005) e (II) o crescimento das ninhadas como um todo, por grupo (Oliveira et al., 2009). A primeira proposta de classificação (I) demonstrou normalidade para os pesos fetais em ambos grupos tratados, já a segunda classificação (II) demonstrou ninhadas estatisticamente menores nos grupos tratados com EECFCp. A análise das classificações em conjunto indica que, mesmo a média do peso fetal indicando redução, mais de 90% da ninhada apresentou peso adequado para a idade gestacional nos grupos tratados, confirmando que o EECFCp não causa alterações no desenvolvimento embriofetal.

Em relação à avaliação genotóxica materna, o ensaio do micronúcleo em sangue periférico demonstrou mais uma vez que o EECFCp é seguro, inclusive no período gestacional, visto que as frequências de danos cromossômicos dos grupos tratados não diferiram do grupo controle. Resultado semelhante já havia sido reportado por Villas Boas et al. (2018a) tanto em machos quanto em fêmeas. Nesse estudo foi demonstrado que o EECFCp não causa danos genômicos e nem cromossômicos, avaliados pelos testes de cometa e micronúcleo, respectivamente; em modelo usando ratos Wistar. Além disso, um outro estudo de Villas Boas et al. (2018b) demonstrou ausência de toxicidade em modelos de toxicidade aguda e de curto prazo em ratos.

Outro fato que chama a atenção é que estudos de teratogenicidade das flavonas e chalconas, principais constituintes do extrato, não estão disponíveis na literatura consultada. Foram encontrados estudos apenas da neohesperidin dihydrochalcone e essa não demonstrou efeitos tóxico-reprodutivos e nem

embriofetotóxicos e/ou teratogênicos (BOOTH, 1974; GUMBMANN et al., 1978; WAALKENS-BERENDSEN; KUILMAN-WAHL; BÄR, 2004). Esses fatos reforçam o ineditismo de nosso estudo. Além disso, o nosso estudo contribui para o crescimento da área bem como reforça a segurança do uso do EECFCp que possui em sua constituição altos teores de flavonas e chalconas.

5. CONCLUSÃO

Nas condições experimentais do presente estudo, os nossos resultados sugerem que o EECFCp é seguro para o uso, inclusive durante o período gestacional, uma vez que não altera parâmetros biométricos, o desempenho reprodutivo de fêmeas e nem o desenvolvimento embriofetal, exceto pela redução do peso fetal. Além disso, a análise fitoquímica indicou a presença de flavonoides, já descritos na literatura, e de forma inédita a presença das chalconas. Diante do exposto, o presente estudo contribui para a área de produtos naturais e desenvolvimento de produtos de importância bioeconômica uma vez que nossos dados reforçam a segurança de uso e consumo humano, inclusive por gestantes, de uma planta com características econômicas, nutricionais e farmacológicas, já amplamente utilizada pela população, e apoia o desenvolvimento de subprodutos biotecnologicamente desenvolvidos a partir dos frutos de *C. pubescens*.

6. REFERÊNCIAS

AGRAWAL, P. K. Flavonoid glycosides. **Carbon-13 NMR of flavonoids**, 1989.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Consulta Pública nº 116**, de 23 de dezembro de 2010. Acesso em: 11 jul. 2018. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/33836/350888/116.pdf/b9adb5e9-362b-4e65-832e-1338bfe12e92?version=1.0>>.

AUHAREK, S. A., DO CARMO VIEIRA, M., CARDOSO, C. A. L., OLIVEIRA, R. J., CUNHA-LAURA, A. L. Reproductive toxicity of *Campomanesia xanthocarpa* (Berg.) in female Wistar rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 148, n. 1, p. 341-343, 2013.

BALLVE, A. C. **Plantas medicinais de uso popular**: atlas farmacognóstico. Editora da ULBRA, 1995.

BARROW, M.V., TAYLOR, W.J. A rapid method for detecting malformation in rat fetuse. **Journal of Morphology**, v. 127, n. 3, p. 291-305, 1969.

BERG, O. **Myrtaceae**. In C. F. P. Martius (Ed.). Flora Brasiliensis v.14, p. 438-459, 1858.

BOOTH, A. N. Long-term toxicity study of neohesperidin dihydrochalcone in rats (a progress report). Unpublished report of the United States Department of Agriculture, 1974.

BYRNE, L. T., CANNON, J. R., GAWAD, D. H., JOSHI, B. S., SKELTON, B. W., TOIA, R. F. W. A. H. The crystal structure of (S)-(-)-6-Bromo-5, 7-dihydroxy-8-methyl-2-phenyl-2, 3-dihydro-4H-1-benzopyran-4-one [(-)-6-bromocryptostrobin] and a ¹³C NMR study of (±)-cryptostrobin and related substances. Revision of the structures of the natural products (±)-lawinal, unonal, 7-O-methylunonal and isounonal. **Australian Journal of Chemistry**, v. 35, n. 9, p. 1851-1858, 1982.

CAMPOS, R. P., HIANE, P. A., RAMOS, M. I. L., RAMOS FILHO, M. M., MACEDO, M. L. R. Conservação pós-colheita de guavira (*Campomanesia* sp.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 34, n. 1, p. 41-49, 2012.

CAMPOS, J. F. Perfil químico e potencial farmacológico de Senna velutina (Fabaceae) e *Campomanesia adamantium* (Myrtaceae). Informações não publicadas. 2018.

CARDOSO, C. A. L., SILVA, J. R. M., KATAOKA, V. M. F., BRUM, C. S., POPPI, N. R. Avaliação da atividade antioxidante, toxicidade e composição química por CG-EM do extrato hexânico das folhas de *Campomanesia pubescens*. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 29, n. 3, p. 297-301, 2009.

CARVALHO, P.C., SANTOS, E.A., SCHNEIDER, B.U.C., MATUO, R., PESARINI, J.R., CUNHA-LAURA, A.L., MONREAL, A.C.D., LIMA, D.P., BROCHADO-ANTONIOLLI, A.C.M., OLIVEIRA, R.J. Diaryl sulfide analogs of combretastatin A-4: Toxicogenetic, immunomodulatory and apoptotic evaluations and prospects for use as a new chemotherapeutic drug. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 40, n. 3, p. 715-721, 2015.

COELHO, D.R., 2010. Desenvolvimento somático, neurocomportamental e fertilidade da prole de ratos exposta ao antimoniato de meglumina pela via transplacentária e leite materno. Dissertação (Mestrado) – Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, Rio de Janeiro.

COSTA-SILVA, J. H., LYRA, M. M., LIMA, C. R., ARRUDA, V. M., ARAÚJO, A. V., RIBEIRO E RIBEIRO, A., WANDERLEY, A. G. Estudo toxicológico reprodutivo da *Carapa guianensis Aublet* (Andiroba) em ratas Wistar. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 25, n. 3, p. 425, 2007.

DA SILVA, É. R. S. SALMAZZO, G. R., DA SILVA ARRIGO, J., OLIVEIRA, R. J., KASSUYA, C. A. L., CARDOSO, C. A. L. Anti-inflammatory Evaluation and Toxicological Analysis of *Campomanesia xanthocarpa* Berg. **Inflammation**, v. 39, n. 4, p. 1462-1468, 2016.

DAMASCENO, D. C., VOLPATO, G. T., SARTORI, T. C. F., RODRIGUES, P. F., PERIN, E. A., CALDERON, I. D. M. P., RUDGE, M. V. C. Effects of *Annona squamosa* extract on early pregnancy in rats. **Phytomedicine**, v. 9, n. 7, p. 667-672, 2002.

DAMASCENO, D.C., KEMPINAS, W.G., VOLPATO, G.T., CONSONNI, M., RUDGE, M.V.C., PAUMGARTTEN, F.J.R. **Anomalias congênitas**: estudos experimentais. Coopmed Editora Médica, Belo Horizonte, 2008.

DE DAVID, N., MAURO, M. O., GONÇALVES, C. A., PESARINI, J. R., STRAPASSON, R. L. B., KASSUYA, C. A. L., OLIVEIRA, R. J. *Gochnatia polymorpha ssp. floccosa*: Bioprospecting of an anti-inflammatory phytotherapy for use during pregnancy. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 154, n. 2, p. 370-379, 2014.

DE LIMA, N. V., ARAKAKI, D. G., TSCHINKEL, P. F. S., DA SILVA, A. F., GUIMARÃES, R. D. C. A., HIANE, P. A., DO NASCIMENTO, V. A. Investigation of Campomanesia Components: A Fruit of Brazilian Cerrado. **Active Ingredients from Aromatic and Medicinal Plants**, p. 71, 2017.

DJERIDANE, A., YOUSFI, M., NADJEMI, B., BOUTASSOUNA, D., STOCKER, P., VIDAL, N. Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. **Food chemistry**, v. 97, n. 4, p. 654-660, 2006.

GAO, Y., WANG, T., WANG, G., LI, G., SUN, C., JIANG, Z., YANG, J., LI, Y., YOU, Y., WU, X., SUN, L., WANG, H., LI, C., TIAN, J., ZHU, J., WANG, K., CHO, S. Preclinical safety of ginsenoside compound K: Acute, and 26-week oral toxicity studies in mice and rats. **Food and Chemical Toxicology**, p. 110578, 2019.

GEBREHIWOT, S., SHUMBAHRI, M., EYADO, A., YOHANNES, T. Phytochemical Screening and In Vivo Antimalarial Activity of Two Traditionally Used Medicinal Plants of Afar Region, Ethiopia, against *Plasmodium berghei* in Swiss Albino Mice. **Journal of Parasitology Research**, v. 2019, 2019.

GICHANGI, P. B., NYONGO, A. O., TEMMERMAN, M. Pregnancy outcome and placental weights: their relationship to HIV-1 infection. **East African medical journal**, v. 70, n. 2, p. 85-89, 1993.

GONÇALVES, C. A., SIQUEIRA, J. M., CAROLLO, C. A., DE OLIVEIRA MAURO, M., DE DAVI, N., CUNHA-LAURA, A. L., AUHAREK, S. A. Gestational exposure to *Byrsonima verbascifolia*: Teratogenicity, mutagenicity and immunomodulation evaluation in female Swiss mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 150, n. 3, p. 843-850, 2013.

GONÇALVES, C.A., SILVA, N.L., MAURO, M.O., DAVID, N., CUNHA-LAURA, A.L., AUHAREK, S.A., MONREAL, A.C.D., VIEIRA, M.C., SILVA, D.B., SANTOS, F.J.L., SIQUEIRA, J.M., OLIVEIRA, R.J. Evaluation of mutagenic, teratogenic, and immunomodulatory effects of *Annona nutans* hydromethanolic fraction on pregnant mice. **Genetics and Molecular Research**, v. 13, p. 4392-4405, 2014.

GUERRERO, F. M. G., ZIMMERMAN, L. R., CARDOSO, E. V., DE LIMA, C. C., PERDOMO, R. T., ALVA, R., GUERRERO, A. T. Investigação da Toxicidade Crônica

das Folhas de Guavira (*Campomanesia pubescens*) em Ratos Machos. **Revista Fitos Eletrônica**, v. 5, n. 02, p. 64-72, 2010.

GUMBMANN, M. R., GOULD, D. H., ROBBINS, D. J., BOOTH, A. N. **Toxicity studies of neohesperidin dihydrochalcone**. Sweeteners and Dental Caries. Information Retrieval Inc., Washington, DC, p. 301-310, 1978.

ISHIKAWA, R. B., VANI, J. M., DAS NEVES, S. C., RABACOW, A. P. M., KASSUYA, C. A. L., CRODA, J., OLIVEIRA, R. J. The safe use of *Dolioscarpus dentatus* in the gestational period: Absence of changes in maternal reproductive performance, embryo-fetal development and DNA integrity. **Journal of ethnopharmacology**, v. 217, p. 1-6, 2018.

LIN, J-Y., TANG, C-Y. Determination of total phenolic and flavonoid contents in selected fruits and vegetables, as well as their stimulatory effects on mouse splenocyte proliferation. **Food chemistry**, v. 101, n. 1, p. 140-147, 2007.

LORENZI, Harri. **Frutas brasileiras e exóticas cultivadas**: de consumo in natura. Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2006.

MAHABADY, M. K., GHOLAMI, M. R., VARZI, H. N., ZENDEDEL, A., DOOSTIZADEH, M. **Protective effect of quercetin on skeletal and neural tube teratogenicity induced by cyclophosphamide in rat fetuses**. In: Veterinary Research Forum. Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran, 2016. p. 133.

MANSON, J. C., CLARKE, A. R., HOOPER, M. L., AITCHISON, L., MCCONNELL, I., HOPE, J. 129/Ola mice carrying a null mutation in PrP that abolishes mRNA production are developmentally normal. **Molecular neurobiology**, v. 8, n. 2-3, p. 121-127, 1994.

MANSON, J.M., KANG, Y.J. Test methods for assessing female reproductive and developmental toxicology. **Principles and Methods of Toxicology**, v. 27, p. 989-1034, 1994.

MARKMAN, B. E. O., BACCHI, E. M., KATO, E. T. M. Antiulcerogenic effects of *Campomanesia xanthocarpa*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 94, n. 1, p. 55-57, 2004.

MUSTAFA, K. A., PERRY, N. B., WEAVERS, R. T. Lipophilic C-methylflavonoids with no B-ring oxygenation in *Metrosideros* species (Myrtaceae). **Biochemical systematics and ecology**, v. 33, n. 10, p. 1049-1059, 2005.

OECD - Organization for Economic Co-Operation and Development. Guideline 423: acute oral toxicity-acute toxic class method. OECD guidelines for the testing of chemicals (section 4: health effects), Paris, 1-14. 2001.

OLIVEIRA, R.J., OLIVA, S.U., DAROZ, G.A., RUBIO, E.M. Fertility assessment and possible external structural defects on progeny from male rats chronically exposed to arsenic. **Revista Brasileira de Toxicologia**, v. 18, n. 1, p. 57, 2005.

OLIVEIRA, R. J., SALLES, M. J. S., DA SILVA, A. F., KANNO, T. Y. N., DOS SANTOS LOURENÇO, A. C., FREIRIA, G. A., MANTOVANI, M. S. Effects of the polysaccharide

β -glucan on clastogenicity and teratogenicity caused by acute exposure to cyclophosphamide in mice. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 53, n. 3, p. 164-173, 2009.

OLIVEIRA, F. A., CONDE, B. E., GOMES, F. T., FONSECA, A. S., CAMPOS, B. C. Potencial de cura e segurança do uso de plantas medicinais na utilização do método da biodigital como tratamento alternativo no grupo de medicina alternativa em Juiz de Fora, MG. **Biológicas & Saúde**, v. 5, n. 17, 2015a.

OLIVEIRA, R. J., MANTOVANI, M. S., PESARINI, J. R., MAURO, M. O., DA SILVA, A. F., SOUZA, T. R., RIBEIRO, L. R. 6-Dimethylaminopurine and cyclohexamide are mutagenic and alter reproductive performance and intrauterine development in vivo. **Genetics and Molecular Research**, v. 14, n. 1, p. 834-49, 2015b.

PESSATTO, L. R., AUHAREK, S. A., GONÇALVES, C. A., DE DAVID, N., MONREAL, A. C. D., KASSUYA, C. A. L., OLIVEIRA, R. J. Effects of dichloromethane and butanol fractions of *Gochnatia polymorpha* subsp. *floccosa* in maternal reproductive outcome, embryo-fetal development and DNA integrity in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 200, p. 205-208, 2017.

RENGASAMY, P. Congenital malformations attributed to prenatal exposure to cyclophosphamide. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 9, p. 1211-1227, 2017.

ROCHA, E. D. O. Avaliação dos constituintes fenólicos e voláteis, atividade antioxidante e antimicrobiana de *Campomanesia pubescens* (DC.) O. Berg. 2011.

SAAD, E. D., HOFF, P. M., CARNELÓS, R. P., KATZ, A., NOVIS, Y. A., PIETROCOLA, M., HAMERSCHLAK, N., TABACOF, J., GANSL, R. C., SIMON, S. D. Critérios comuns de toxicidade do Instituto Nacional de Câncer dos Estados Unidos. **Revista Brasileira de Cancerologia**, 48, 63-96. 2002.

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

SOLLADIÉ, G., GEHROLD, N., MAIGNAN, J. Biomimetic synthesis of the flavanone Leridol, revision of the structure of the natural product. **European journal of organic chemistry**, v. 1999, n. 9, p. 2309-2314, 1999.

SOULIMANE-MOKHTARI, N.A., GUERMOUCHE, B., YESSOUFOU, A., SAKER, M., MOUTAIROU, K., HICHAMI, A., KHAN, N.A. Modulation of lipid metabolism by n- 3 polyunsaturated fatty acids in gestational diabetic rats and their macrosomic offspring. **Clinical Science**, v. 109, n. 3, p. 287-295, 2005.

SRIVASTAVA, R., SHAW, A. K., KULSHRESHTHA, D. K. Triterpenoids and chalcone from *Syzygium samarangense*. **Phytochemistry**, v. 38, n. 3, p. 687-689, 1995.

STAPLES, R.E., SCHENELL, V. L. Refinements in rapid clearing technic in the KOH-alizarin red method for fetal bone. **Stain Technology**, v. 39, p. 61-63, 1964.

TAYLOR, P. **Practical Teratology**. Academic Press, New York, p. 77-100, 1986.

VALLILO, M. I.; LAMARDO, L. C. A.; GABERLOTTI, M. L.; OLIVEIRA, E. D.; MORENO, P. R. H. Composição química dos frutos de *Campomanesia adamantium* (Cambessédés) O. Berg. **Ciência e tecnologia de alimentos**, v. 26, n. 4, p. 725-955, 2006.

VANI, J. M., DE CARVALHO SCHWEICH, L., DE OLIVEIRA, K. R. W., AUHAREK, S. A., CUNHA-LAURA, A. L., ANTONIOLLI-SILVA, A. C. M. B., OLIVEIRA, R. J. Evaluation of the effects of the larvicides temephos on reproductive performance, embryofetal development and DNA integrity of Swiss mice. **Pesticide biochemistry and physiology**, 2018a.

VANI, J. M., MONREAL, M. T. F. D., AUHAREK, S. A., CUNHA-LAURA, A. L., DE ARRUDA, E. J., LIMA, A. R., OLIVEIRA, R. J. The mixture of cashew nut shell liquid and castor oil results in an efficient larvicide against *Aedes aegypti* that does not alter embryo-fetal development, reproductive performance or DNA integrity. **PloS one**, v. 13, n. 3, p. e0193509, 2018b.

VIECILI, P. R. N., BORGES, D. O., KIRSTEN, K., MALHEIROS, J., VIECILI, E., MELO, R. D., KLAFKE, J. Z. Effects of *Campomanesia xanthocarpa* on inflammatory processes, oxidative stress, endothelial dysfunction and lipid biomarkers in hypercholesterolemic individuals. **Atherosclerosis**, v. 234, n. 1, p. 85-92, 2014.

VILLAS BOAS, G. R., DE ARAÚJO, F. H. S., MARCELINO, J. M., CASTRO, L. H. A., DA SILVEIRA, A. P. S., NACER, R. S., OESTERREICH, S. A. Preclinical safety evaluation of the ethanolic extract from *Campomanesia pubescens* (Mart. ex DC.) O. BERG (guavira) fruits: analysis of genotoxicity and clastogenic effects. **Food & Function**, 2018a.

VILLAS BOAS, G. R., DOS SANTOS, A. C., SOUZA, R. I. C., DE ARAÚJO, F. H. S., TRAESEL, G. K., MARCELINO, J. M., OESTERREICH, S. A. Preclinical safety evaluation of the ethanolic extract from guavira fruits (*Campomanesia pubescens* (DC) O. BERG) in experimental models of acute and short-term toxicity in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 118, p. 1-12, 2018b.

VILLAS BOAS, G. R., STEFANELLO DA SILVEIRA, A. P., FEITOSA FARINELLI, B. C., LIMA CARDOSO, C. A., ARCE, E., OESTERREICH, S. A. The ethanolic extract obtained from *Campomanesia pubescens* (DC) O. BERG fruits exerts anxiolytic and antidepressant effects on chronic mild stress model and on anxiety models in Wistar rats: Behavioral evidences. **Nutritional neuroscience**, p. 1-11, 2018c.

WAALKENS-BERENDSEN, D. H., KUILMAN-WAHLIS, M. E. M., BÄR, A. Embryotoxicity and teratogenicity study with neohesperidin dihydrochalcone in rats. **Regulatory toxicology and pharmacology**, v. 40, n. 1, p. 74-79, 2004.

WILSON, J.G. **Methods for administering agents and detecting malformations in experimental animals**. Teratology, p. 262-277, 1965.

WISE, L.D., BECK, S.L., BELTRAME, D., BEYER, B.K., CHAHOUD, I., CLARK, R.L., HENWOOD, S.M. Terminology of developmental abnormalities in common laboratory mammals (version 1). **Congenital Anomalies**, v. 37, n. 2, p. 165-210, 1997.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A finalidade de estudos tóxico-reprodutivos, teratogênicos e genotóxicos é detectar agentes causadores de danos e/ou malformações e, para isso, a utilização de modelos de experimentação animal é a melhor maneira de prevenir uma possível ação nociva da substância em teste.

Nossos estudos demonstraram que o EECFCp é seguro para ser utilizado, visto que não foi materno tóxico, não causando alterações nos parâmetros biométricos e desempenho reprodutivo, não alterou o desempenho reprodutivo, exceto pela redução do peso fetal, não foi embriotóxico, não teve ação teratogênica ou genotóxica.

7. ANEXOS

A - Tabelas referentes as figuras

Tabela referente às figuras 4, 5 e 6 - Parâmetros biométricos e pesos absolutos e relativos dos órgãos de fêmeas tratadas com o extrato etanólico das cascas dos frutos de *C. pubescens* (EECF Cp).

Grupos experimentais	Parâmetros Biométricos				
	Peso Inicial	Peso Final	Ganho de Peso	Peso do Útero	Peso Líquido
Controle	34,76 ± 0,68 ^a	53,72 ± 2,30 ^{a,b}	18,96 ± 2,05 ^{a,b}	17,42 ± 2,09 ^a	1,53 ± 1,36 ^a
EECF Cp 100	36,91 ± 1,66 ^a	59,41 ± 2,01 ^a	22,50 ± 1,63 ^a	19,18 ± 1,78 ^a	3,32 ± 0,62 ^a
EECF Cp 1000	36,92 ± 1,28 ^a	52,07 ± 1,41 ^b	15,15 ± 1,74 ^b	15,31 ± 1,36 ^a	-0,16 ± 0,95 ^a
Peso absoluto dos órgãos (g)					
	Coração	Pulmão	Baço	Rins	Fígado
Controle	0,18 ± 0,009 ^a	0,27 ± 0,02 ^a	0,15 ± 0,01 ^a	0,39 ± 0,01 ^a	2,39 ± 0,13 ^a
EECF Cp 100	0,21 ± 0,009 ^a	0,27 ± 0,01 ^a	0,17 ± 0,01 ^a	0,67 ± 0,25 ^a	2,63 ± 0,27 ^a
EECF Cp 1000	0,18 ± 0,006 ^a	0,26 ± 0,01 ^a	0,16 ± 0,02 ^a	0,39 ± 0,01 ^a	2,34 ± 0,09 ^a
Peso relativo dos órgãos (g)					
	Coração	Pulmão	Baço	Rins	Fígado
Controle	0,003 ± 0,0001 ^a	0,005 ± 0,0002 ^a	0,003 ± 0,0002 ^a	0,007 ± 0,0003 ^a	0,044 ± 0,0014 ^a
EECF Cp 100	0,003 ± 0,0001 ^a	0,004 ± 0,0002 ^a	0,002 ± 0,0002 ^a	0,011 ± 0,0042 ^a	0,044 ± 0,0044 ^a
EECF Cp 1000	0,003 ± 0,0001 ^a	0,005 ± 0,0003 ^a	0,003 ± 0,0004 ^a	0,007 ± 0,0003 ^a	0,045 ± 0,0012 ^a

Legenda: Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas. (Teste: Análise de Variância/Tukey; p>0,05).

Tabela referente à figura 7 - Frequência de micronúcleos encontrados em fêmeas tratadas com o extrato etanólico das cascas dos frutos de *C. pubescens* (EECFCp).

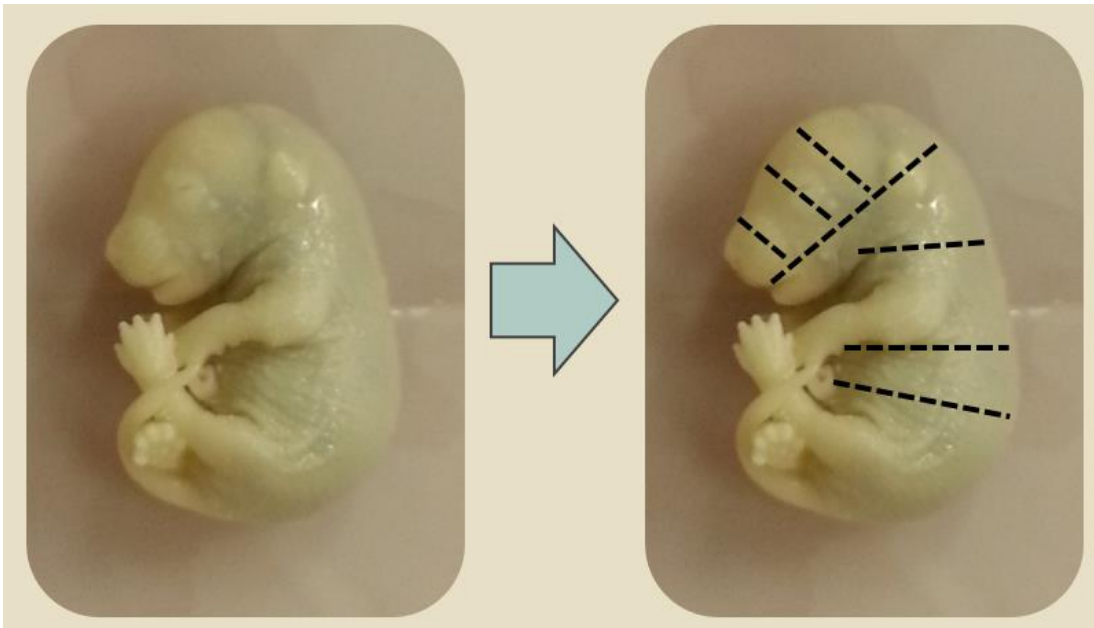
Grupos experimentais	Micronúcleo		
	16ºd.g.	17ºd.g.	18ºd.g.
Controle	4,0±0,36 ^a	3,2±0,53 ^a	3,0±0,45 ^a
EECFCp 100	4,1±0,58 ^a	3,1±0,50 ^a	3,5±0,43 ^a
EECFCp 1000	3,9±0,41 ^a	4,0±0,39 ^a	3,7±0,75 ^a

Legenda: Diferentes letras indicam diferenças estatisticamente significativas. (Teste de Análise de Variância/Tukey; $p>0,05$).

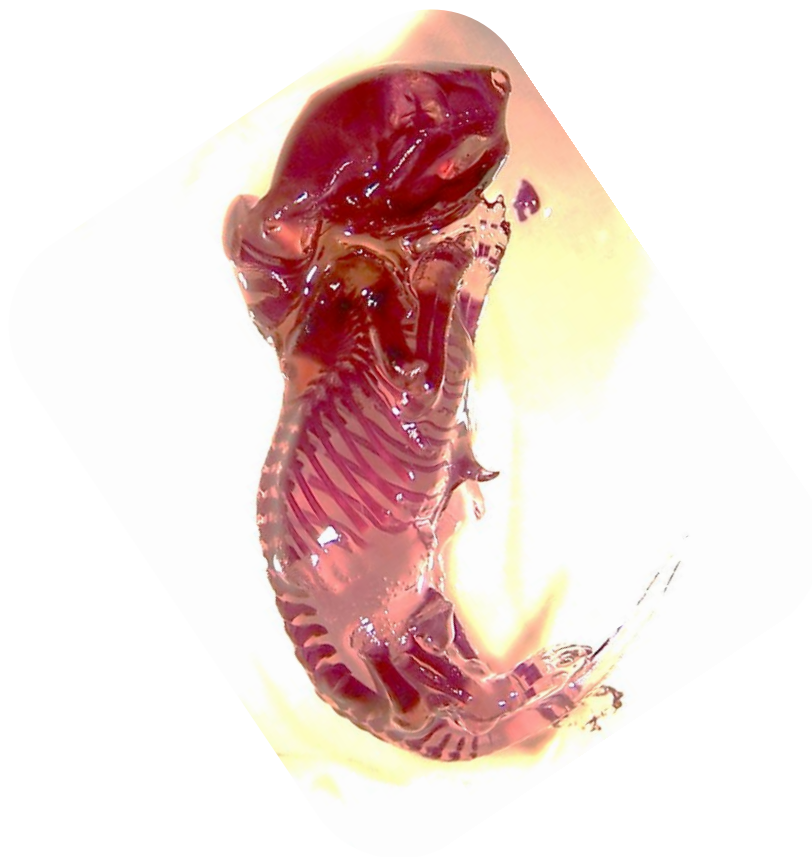
B - Imagens referentes aos experimentos



B.1 - *Plug vaginal.*



B.2 - Cortes estratégicos da análise visceral.



B.3 - Feto após diafanizado e corado para análise esquelética

C - Certificado de aprovação do projeto pelo CEUA/UFMS



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



C E R T I F I C A D O

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação dos efeitos tóxico-reprodutivos, teratogênicos e (anti)genotóxicos dos extratos etanólicos de plantas com possíveis efeitos medicinais em camundongos Swiss", registrada com o nº 965/2018, sob a responsabilidade de **Rodrigo Juliano Oliveira** - que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 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 de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL/UFMS, na 6ª reunião ordinária do dia 07/08/2018.

FINALIDADE	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	1º/10/2018 a 30/03/2020
Espécie/Linhagem/Raça	<i>Mus musculus</i> / Swiss
Nº de animais	Machos 620 / Fêmeas 520 = 1.140
Peso/Idade	30g / 8 - 10 semanas
Sexo	Machos e Fêmeas
Origem	Biotério - UT/INBIO/UFMS

Joice Stein
Coordenadora da CEUA/UFMS
Campo Grande, 08 de agosto de 2018.

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA
<http://www.propp.ufms.br/ceua>
ceua.propp@ufms.br
fone (67) 3345-7925

D - Resolução de aprovação do projeto de pesquisa pelo Programa de Pós Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste.



Serviço Público Federal
Ministério da Educação

Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



RESOLUÇÃO Nº 261, DE 17 DE DEZEMBRO DE 2018.

A PRESIDENTE EM EXERCÍCIO DO COLEGIADO DE CURSO DOS CURSOS DE MESTRADO E DOUTORADO EM SAÚDE E DESENVOLVIMENTO NA REGIÃO CENTRO-OESTE da Faculdade de Medicina da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, no uso de suas atribuições legais, resolve, *ad referendum*:

1. Aprovar a **ALTERAÇÃO** do Projeto de Pesquisa, vinculado ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, que passa a ser intitulado: **"AVALIAÇÃO DOS EFEITOS TÓXICO-REPRODUTIVOS, TERATOGÊNICOS E (ANTI) GENOTÓXICOS DO EXTRATO ETANÓLICO DE CAMPOMANESIA PUBESCENS EM CAMUNDONGOS SWISS"** sob a responsabilidade da aluna de Doutorado **YASMIN LANY VENTURA SAID**, RGA 201735487, e orientação da Prof^a. **Andreia Conceicao Milan Brochado Antonioli da Silva**.

2. Toda pesquisa que envolva aspectos éticos deve ser submetida à apreciação de um Comitê de Ética de Pesquisa em Seres Humanos ou Comissão de Ética no Uso de Animais antes de iniciar a coleta de dados.

3. Após aprovação pelo Comitê/Comissão de Ética, uma cópia digital do Parecer deverá ser enviada à secretaria do Programa.

PRISCILA AIKO HIANE



Documento assinado eletronicamente por Priscila Aiko Hiane, Coordenador(a) de Curso de Pós-graduação, Substituto(a), em 19/12/2018, às 09:49, conforme horário oficial de Mato Grosso do Sul, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufms.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador 0949777 e o código CRC 1D91A0DD.

COORDENAÇÃO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E DESENVOLVIMENTO NA REGIÃO CENTRO-OESTE

Av Costa e Silva, s/nº - Cidade Universitária

Fone:

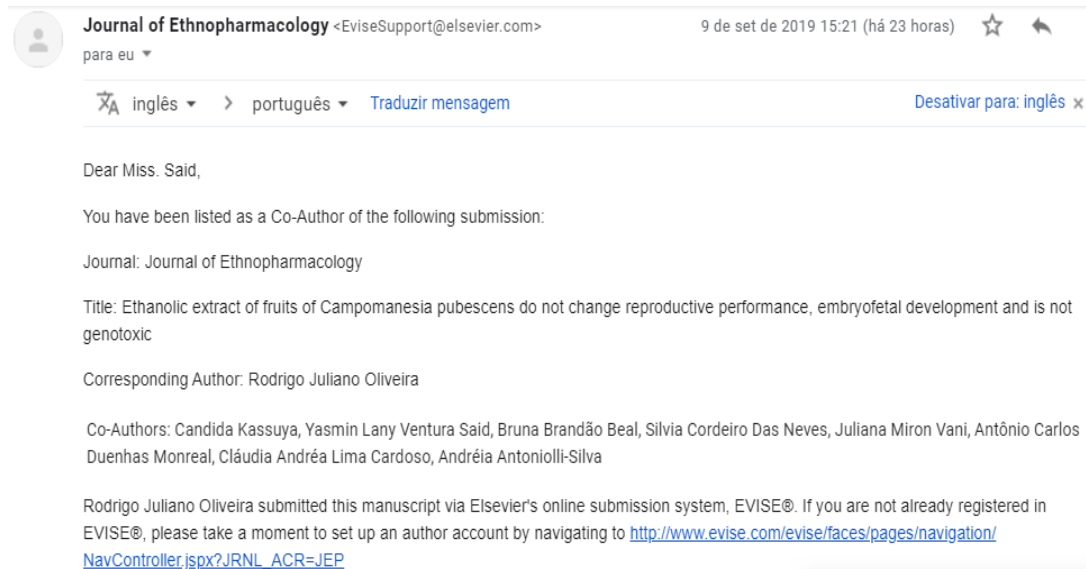
CEP 79070-900 - Campo Grande - MS

Referência: Processo nº 23104.000046/2018-01

SEI nº 0949777



E - Email de comprovação da submissão do manuscrito à Journal of Ethnopharmacology



F - Primeira página da submissão do manuscrito à Journal of Ethnopharmacology

Manuscript Details

Manuscript number	JEP_2019_3404
Title	Ethanol extract of fruits of <i>Campomanesia pubescens</i> do not change reproductive performance, embryofetal development and is not genotoxic
Article type	Research Paper

Abstract

Ethnopharmacological relevance: *Campomanesia pubescens* is traditionally used in folk medicine to the treatment of gastrointestinal and bladder disorders. In addition, is described to have anti-inflammatory, anxiolytic, antidepressant, antimicrobial and antiproliferation action. Aim of the study: evaluate the toxic-reproductive, teratogenic and genotoxic effects of ethanol extract of fruits of *Campomanesia pubescens* (EEFCp) in Swiss mice. Material and methods: Were realized the phytochemical characterization of extract through CTLC and PTLC. In biological assays were used 30 pregnant female Swiss mice, distributed in three experimental groups (n=10) – control, EEFCp 100mg/kg and EEFCp 1000mg/kg. The treatments were during all gestational period. Were evaluated biometric parameters, reproductive performance, embryofetal development, teratogenicity and genetic toxicology assays. Results: The phytochemical study showed that EEFCp has as principal component flavanones and chalcones. EEFCp did not change biometric parameters, reproductive performance, embryofetal development and therefore is not teratogenic. However, was able to reduce the weight of fetuses, being considered small for pregnancy age and the litter classified as with low weight for gestational age. In addition, was observed that EEFCp is not genotoxic during gestational period. Conclusion: EEFCp do not cause variations in biometric parameters, reproductive performance, embryofetal development and DNA integrity, so is safe for human consumption, including in gestational period. This fact enhances the economic, nutritional and pharmacological characteristics *C. pubescens* fruits.

Keywords	Teratogenesis; Toxicity; Medicinal plant; Guavira; Malformations
Taxonomy	Toxicology, Pharmacology, In Vivo Toxicology
Corresponding Author	Rodrigo Juliano Oliveira
Corresponding Author's Institution	Federal University of Mato Grosso do Sul
Order of Authors	Yasmin Lany Ventura Said, Bruna Brandão Beal, Sílvia Cordeiro Das Neves, Juliana Miron Vani, Antônio Carlos Duenhas Monreal, Cláudia Andréia Lima Cardoso, Candida Kassuya, Rodrigo Juliano Oliveira, Andréia Antoniolli-Silva

Submission Files Included in this PDF

File Name	[File Type]
Cover letter.docx	[Cover Letter]
EEFCp Co-authors.docx	[Checklist]
Highlights.docx	[Highlights]
Graphical abstract 300.tiff	[Graphical Abstract]
JEP_Campomanesia pubescens teratogenesis.docx	[Manuscript File]
declaration-of-competing-interests.docx	[Author Agreement]

To view all the submission files, including those not included in the PDF, click on the manuscript title on your EVISE Homepage, then click 'Download zip file'.

Research Data Related to this Submission

There are no linked research data sets for this submission. The following reason is given:
Data will be made available on request