



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



LUCAS FELIPE DE MELO ALCÂNTARA

**PERFIL FITOQUÍMICO E EFEITOS TOXICOLÓGICOS, GENOTÓXICO E
MUTAGÊNICO DOS EXTRATOS AQUOSOS DA *Commiphora leptophloeos*
(MART.) J.B. GILLET**

Recife
2021

LUCAS FELIPE DE MELO ALCANTARA

**PERFIL FITOQUÍMICO E EFEITOS TOXICOLÓGICOS, GENOTÓXICO E
MUTAGÊNICO DOS EXTRATOS AQUOSOS DA *Commiphora leptophloeos*
(MART.) J.B. GILLETT**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Biotecnologia.

Orientador: Prof^o. Dra. Márcia Vanusa da Silva

Coorientador: Prof^o. Dr^o. Francisco Carlos Amanajás de Aguiar Júnior.

Recife

2021

Catálogo na fonte:
Bibliotecária Claudina Queiroz, CRB4/1752

Alcântara, Lucas Felipe de Melo

Perfil fitoquímico e efeitos toxicológicos, genotóxico e mutagênico dos extratos aquosos da *Commiphora leptophloeos* (Mart.) J.B. Gillett / Lucas Felipe de Melo Alcântara - 2021.

54 folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Márcia Vanusa da Silva

Coorientador: Francisco Carlos Amanajás de Aguiar Júnior

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas. Recife, 2021.

Inclui referências.

1. Planta medicinal 2. Caatinga 3. Toxicologia

I. Silva, Márcia Vanusa da (Orientadora) II. Aguiar Júnior, Francisco Carlos Amanajás de (Coorientador) III. Título

615.3 CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2022-029

LUCAS FELIPE DE MELO ALCÂNTARA

**PERFIL FITOQUÍMICO E EFEITOS TOXICOLÓGICOS, GENOTÓXICO E
MUTAGÊNICO DOS EXTRATOS AQUOSOS DA *Commiphora leptophloeos*
(MART.) J.B. GILLETT**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Biotecnologia.

Aprovada em: 29/04/2021.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Márcia Vanusa da Silva (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Thiago Henrique Napoleão (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Cristiano Aparecido Chagas (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

AGRADECIMENTOS

Ao longo destes dois anos muitas mudanças ocorreram em minha vida. Muitas pessoas passaram a fazer parte dela e outras deixaram. De qualquer forma, há dentro de mim um pouco de cada uma delas. Gostaria de iniciar este tópico agradecendo a todas estas pessoas. Agradeço ainda a minha família, que mesmo estando tão longe fisicamente, me influenciam a querer ir mais além. Minha mãe, Joelma Maria de Melo Alcântara, meu pai Aguinaldo Alcântara Dionizio, meus irmãos Luan Henrique de Melo Alcântara, Layane Kelly de Melo Alcântara e Laerte de Melo Alcântara. Minhas avós Maria Severina do Carmo Melo e Josefa Rosa de Alcântara. Eu amo todos vocês incondicionalmente. Não posso esquecer dos meus melhores amigos, as pessoas que surgiram em minha vida por acaso e fazem com que todo o fardo seja mais leve, Pedro Thiago, Itamar Rodrigues, Raquel Cavalcante, Márcia Maria, vocês foram e são essenciais para que eu possa continuar. Valdemio Ruan de Souza Nascimento, não tenho palavras para descrever tudo que tem feito, o quanto tem me ensinado a crescer como pessoa e como profissional, obrigado por todo estímulo e por estar sempre presente. Agradeço imensamente aos meus orientadores, Márcia Vanusa da Silva, por abrir as portas e me proporcionar tanto aprendizado e crescimento; e minha grande inspiração profissional, Francisco Carlos Amanajás de Aguiar Júnior, que me acompanha desde tão cedo, minha eterna gratidão. Agradeço a todos os colegas de laboratório, Núcleo de Bioprospecção da Caatinga, aos colegas de turma e toda coordenação do PPGCB-UFPE que me proporcionam experiências inesquecíveis. Obrigado a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pelo apoio financeiro, sem isso eu não teria conseguido.

RESUMO

A *Commiphora leptophloeos* é uma planta nativa da caatinga utilizada para fins artesanais, estruturais, energéticos e medicinais. É conhecida popularmente por seus efeitos antiinflamatórios, cicatrizantes e efeitos contra doenças respiratórias e intestinais. O objetivo deste trabalho foi verificar a composição fitoquímica dos extratos aquosos da casca e folha da *C. leptophloeos*, avaliar potencial antioxidante e citotoxicidade *in vitro*, e toxicidade aguda, genotoxicidade e mutagenicidade *in vivo*. A planta foi coletada na cidade de Buíque, Pernambuco, Brasil, feita a análise fitoquímica por Cromatografia Líquida de alta eficiência, feita a determinação de compostos fenólicos e flavonóides, utilizando como curva padrão ácido gálico e a quercetina, posteriormente foi avaliada a atividade antioxidante por DPPH e fosfomolibdênio. A citotoxicidade foi verificada pelo método MTT em macrófagos (J774.A1) e células de Adenocarcinoma Humano da glândula mamária (MDA-MB-231). A toxicidade subaguda foi feita em camundongos *Mus musculus*, que receberam uma dose única por gavagem (2g/kg) e foram avaliados seguindo os protocolos da OCDE (2002). O sangue e órgãos dos animais foram coletados para análises bioquímicas e histopatológicas. Para os ensaios de mutagenicidade e genotoxicidade, os camundongos receberam uma única dose dos extratos, após seis horas foram coletados 15 µL de sangue pela veia caudal para realização do ensaio cometa. Após 48 horas, esses animais foram anestesiados e coletados 1 mL de sangue por punção cardíaca como endpoint para realização do teste de micronúcleo. Foram identificados nos extratos da casca o ácido gálico, catequina e epicatequina, e na folha o ácido clorogênico. Ambos os extratos apresentaram potencial antioxidante *in vitro*, não houve alteração na viabilidade celular, os animais não apresentaram sinais de toxicidade e o sangue e órgãos não apresentaram alterações. Os testes de micronúcleo e ensaio cometa também não apresentaram alterações, não havendo genotoxicidade e mutagenicidade. Sendo assim, as doses testadas dos extratos não mostraram efeitos danosos *in vitro* e *in vivo*.

Palavras-chave: Planta medicinal; caatinga; toxicologia; etnofarmacologia; etnobotânica.

ABSTRACT

Commiphora leptophloeos is a native plant of the caatinga used for artisanal, structural, energetic and medicinal purposes. It is popularly known for its anti-inflammatory, healing and effects against respiratory and intestinal diseases. The objective of this work was to verify the phytochemical composition of aqueous extracts of the bark and leaves of *C. leptophloeos*, to evaluate antioxidant potential and cytotoxicity *in vitro*, and acute toxicity, genotoxicity and mutagenicity *in vivo*. The plant was collected in the city of Buíque, Pernambuco, Brazil, performed the phytochemical analysis by high performance liquid chromatography, determined the phenolic compounds and flavonoids, using as standard curve gallic acid and quercetin, the antioxidant activity was evaluated by DPPH and phosphomolybdenum. Cytotoxicity was verified by the MTT method in macrophages (J774.A1) and Human Mammary Adenocarcinoma cells (MDA-MB-231). Subacute toxicity was performed in *Mus musculus* mice, which received a single dose by gavage (2g/kg) and were evaluated following OECD protocols (2002). The blood and organs of the animals were collected for biochemical and histopathological analyses. For the mutagenicity and genotoxicity assays, the mice received a single dose of the extracts, after six hours, 15 μ L of blood were collected through the tail vein to perform the comet assay. After 48 hours, these animals were anesthetized and 1 mL of blood was collected by cardiac puncture as an endpoint for performing the micronucleus test. Gallic acid, catechin and epicatechin were identified in the bark extracts, and chlorogenic acid in the leaf. Both extracts showed antioxidant potential *in vitro*, there was no change in cell viability, the animals showed no signs of toxicity and the blood or organs showed no changes. The micronucleus and comet assays also showed no alterations, with no genotoxicity or mutagenicity. Thus, the tested doses of the extracts did not show harmful effects *in vitro* and *in vivo*.

Keywords: Medicinal Plant; caatinga; toxicology; ethnopharmacology; Ethnobotany.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	8
1.1	OBJETIVOS	10
1.1.1	Objetivo Geral	10
1.1.2	Objetivos Específicos	10
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	11
2.1	PRODUTOS NATURAIS E AS PLANTAS MEDICINAIS	11
2.2	POTENCIAL FARMACOLÓGICO DAS PLANTAS	12
2.3	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE ATRIBUÍDA ÀS PLANTAS MEDICINAIS	14
2.4	CAATINGA: ASPECTOS SOCIOECONÔMICOS E ETNOBOTÂNICOS	15
2.5	EFEITOS TOXICOLÓGICOS DAS PLANTAS	18
2.6	COMMIPHORA LEPTOPHLOEOS	19
3	RESULTADOS	22
3.1	ARTIGO – PERFIL FITOQUÍMICO, SEGURANÇA TOXICOLÓGICA, GENOTÓXICA, MUTAGÊNICA, CITOTÓXICA E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS AQUOSOS DA <i>Commiphora leptophloeos</i> (MART.) JB GILLETT	22
4	CONCLUSÕES	44
5	REFERÊNCIAS	45

1 INTRODUÇÃO

A utilização de plantas medicinais é uma prática corriqueira e antiga da humanidade, ocorrendo desde a Pré-História, é uma prática milenar constituída pelo senso comum, que está diretamente relacionada com a cultura construída ao longo do tempo (ROCHA; ROCHA, 2006; VIEIRA, 2008). É uma prática que vem ganhando cada vez mais espaço nos dias de hoje, pois, de acordo com Mendes et al. (2018), é uma opção curativa de baixo custo, comparada a outras alternativas terapêuticas.

No Brasil a utilização de plantas medicinais é autorizada pelo ministério da saúde, que retrata plantas medicinais como drogas vegetais e reafirma a eficácia delas no tratamento de diversos sintomas e doenças, baseada na utilização tradicional e estudos feitos no Brasil e no mundo (BRASIL, 2006). Assim como as plantas medicinais, os fitoterápicos, produtos naturais sem inserção de princípios ativos comercializados em diversas formas farmacêuticas, também são autorizados no Brasil desde que haja garantia de sua reprodutibilidade e constância, além da eficácia e segurança para consumo (BRASIL, 2010).

O que garante os efeitos farmacológicos das plantas medicinais são seus metabólitos, produzidos pelo metabolismo primário ou secundário. De acordo com Newman e Cragg (2012), os medicamentos produzidos entre os anos de 1981 e 2010, 50% tem em sua constituição os metabólitos secundários, e dentre os medicamentos que combatem infecções, aproximadamente 75% são de origem natural ou derivados. Mesmo havendo vasta utilização das plantas para fins medicinais, Bisht et al. (2006) estimam que cerca de 15% a 20% das plantas no mundo são conhecidas cientificamente.

Contudo, as plantas medicinais, além de apresentarem eficácia terapêutica, também podem apresentar efeitos tóxicos. Muitas delas, apresentam esses efeitos adversos visíveis pelos usuários a partir de seu uso, porém, algumas são alterações metabólicas que só são percebidas a longo prazo, principalmente quando associadas a outros medicamentos. Geralmente quando os usuários fazem uso destas plantas, não buscam informações de fontes seguras acerca da planta, o que pode ser considerado um problema de saúde pública (TUROLLA; NASCIMENTO, 2006). Por isso, são necessários estudos que comprovem além de sua eficácia, o nível de

toxicidade, a fim de definir uma margem de segurança para a utilização pela sociedade.

O Brasil abriga cerca de 20% da biodiversidade mundial (ALBUQUERQUE; OLIVEIRA, 2007), e isso o torna uma boa fonte de produtos a serem estudados. De acordo com Ribeiro e Colaboradores (2014) os estudos com plantas medicinais tem se intensificado na Caatinga, um domínio fitogeográfico exclusivamente brasileiro. Nesta região, os recursos para sobrevivência são limitados, sendo então baseados na Agricultura e utilização das plantas para sobrevivência, tendo como única alternativa terapêutica, na maioria das vezes, as plantas medicinais (SILVA et al., 2015). Sendo essa, uma prática persistente e de longas datas, muitos são os conhecimentos tradicionais a respeito das plantas nesta região brasileira e que devido a modernização e expansão dos centros urbanos podem se perder (PILLA, 2006). Por isso a importância de ir em busca deste conhecimento tradicional e a necessidade de comprovação da eficácia e segurança destas plantas.

A *Commiphora leptophloeos*, por exemplo, é uma planta medicinal presente na caatinga, conhecida popularmente como umburana de cambão. É preparada por decocto ou deixada de molho para ser utilizada como anti-inflamatório, cicatrizante, no combate de doenças respiratórias, digestivas, renais e urinárias (ALBUQUERQUE et al., 2007; CARTAXO et al., 2010). Estudo mostra que os óleos extraídos das folhas apresentam efeito inibidor da oviposição do *Aedes aegypti* e atividade larvicida (DA SILVA et al., 2015). Diferentes tipos de extratos preparados a partir das folhas, casca, caule e galhos também apresentam efeitos biológicos, bem como efeitos antioxidante (CORDEIRO et al., 2021), anti-inflamatório (DANTAS-MEDEIROS et al., 2021a), antimicrobiano (DE SOUZA PEREIRA et al., 2017), antidiarreico (PESSOA et al., 2021), anti-biofilme (TRENTIN et al., 2013). Estas atividades são sustentadas pela presença e combinação de determinados compostos químicos, foram descritos nos extratos a presença de compostos fenólicos, flavonóides, ácido gálico, ácido clorogênico, ácido protocatecuico, hinoquinina e nos óleos foram vistos mais de cinquenta componentes (DE SOUZA PEREIRA et al., 2017; DANTAS-MEDEIROS et al., 2021a).

Com isso, neste trabalho, objetivamos realizar uma avaliação toxicológica de extratos aquosos da casca e folhas da *C. leptophloeos*, além de definir sua composição química e os efeitos antioxidantes.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Verificar o perfil toxicológico *in vivo*, citotoxicológico e atividade antioxidante *in vitro* dos extratos aquosos da casca e folhas da *Commiphora leptophloeos*.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Descrever de forma qualitativa o perfil fitoquímico de ambos os extratos;
- Avaliar atividade antioxidante dos extratos obtidos *in vitro* pela redução do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) e pelo Complexo fosfomolibdênio *in vitro*;
- Determinar os teores de fenóis e de flavonóides dos extratos obtidos;
- Avaliar a citotoxicidade dos extratos em linhagens de macrófagos e em células de adenocarcinoma mamário humano *in vitro*;
- Determinar o efeito genotóxico e mutagênico dos extratos em camundongos;
- Estabelecer o nível de toxicidade oral aguda em camundongos.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 PRODUTOS NATURAIS E AS PLANTAS MEDICINAIS

Os produtos naturais são substâncias químicas extraídas da natureza que apresentam atividades biológicas (ANDRES-RODRIGUEZ et al., 2015). Estes compostos apresentam uma grande diversidade química, garantindo para humanidade uma fonte de produtos a serem estudados como diversas alternativas nutricionais e farmacológicas (MARQUES et al., 2017). Eles estão presentes nas plantas, microrganismos, animais e organismos marinhos, e vêm inspirando ao longo do tempo a formulação de diversos fármacos. Estima-se que de 50% a 70% dos fármacos comercializados hoje são inspirados em produtos naturais (NEWMAN; CRAGG, 2016; PYE et al., 2017).

A utilização destes produtos foi se aperfeiçoando de acordo com a sociedade e as necessidades decorrentes, juntamente com o avanço científico e aprimoramento das técnicas, o que possibilitou uma diversidade de formulações. Hoje, eles são amplamente utilizados pelas indústrias farmacêuticas e biotecnológicas, que têm investido em pesquisas neste campo, a fim de potencializar e criar novas moléculas e formulações baseadas nos produtos de origem natural (HUANG et al., 2019), visto que, tratam-se de recursos renováveis de baixo custo, fácil acesso e geralmente com baixa toxicidade (DRASAR; KHRIPACH, 2019).

Dentre os produtos naturais, as plantas são as mais utilizadas. Os primeiros seres humanos tinham amplo conhecimento sobre suas propriedades medicinais e nutricionais, que foram passados para as civilizações posteriores e se moldando, acompanhando os contextos históricos em que estiveram inseridas (GEORGE et al., 2016). Estudos realizados em Pernambuco relataram a presença de pólen de plantas com propriedades medicinais em coprólitos e os pesquisadores sugeriram que tenham sido usadas para combater sintomas provocados por helmintos (TEIXEIRA-SANTOS et al., 2015). Isso nos faz acreditar que no Brasil as plantas são utilizadas para fins medicinais desde a Pré-História. Este saber é passado entre as gerações e muitas informações sofrem modificações ou acabam se perdendo, seja de forma intencional ou não (DANTAS-MEDEIROS et al., 2021b).

Antes, as plantas, eram os principais agentes usados contra patologias no mundo, e hoje ainda contribuem de forma significativa para o desenvolvimento de métodos terapêuticos (SOLDATI et al., 2015). De acordo com a Organização Mundial da Saúde, 80% da população mundial utiliza plantas para fins de cura (ESCALONA CRUZ et al., 2015). A preferência por produtos desta natureza tem aumentado, sobretudo em países desenvolvidos e em desenvolvimento, devido a preocupação com o acometimento de doenças crônicas e por serem produtos naturais, acreditando que possuem menos efeitos toxicológicos ao organismo. Porém, algumas comunidades pelo mundo têm as plantas como única alternativa farmacológica (ANDRES-RODRIGUEZ et al., 2015).

No Brasil, seu uso é autorizado em necessidades básicas de saúde, contudo, essas plantas precisam ter eficácia e segurança toxicológica comprovada cientificamente. Em 2009, o Ministério da Saúde brasileiro publicou uma lista de 71 espécies de medicamentos, conhecida como Lista Nacional de Plantas Medicinais de Interesse para Sistema Único de Saúde (RENISUS), as quais são de interesse para uso terapêutico da população (BRASIL., 2009). Com isso, elas são submetidas a análises de cunho físico-químico, aplicações biológicas e terapêuticas *in vivo* e *in vitro*. Os efeitos são avaliados em estudos pré-clínicos e clínicos, a fim de delinear um melhor uso, legitimando e/ou aperfeiçoando o uso delas pelas comunidades.

O Brasil possui uma grande biodiversidade vegetal, com grande número de endemismo distribuídos em cinco regiões fitogeográficas, e com populações tradicionais que possuem um conhecimento cultural e histórico imenso acerca das plantas medicinais (RIBEIRO et al., 2018). Contudo, a demanda industrial e o extrativismo local pelas populações têm provocado a extinção de muitas espécies de seus habitats naturais. Somado a isso, a aculturação tem feito com que o conhecimento tradicional esteja se perdendo ao longo dos últimos anos, o que justifica a importância urgente de conhecer e registrar melhor a cultura sobre as plantas medicinais, advindos de povos indígenas, africanos e europeus que foram se moldando às realidades do Brasil (TEIXIDOR-TONEU et al., 2018).

2.2 POTENCIAL FARMACOLÓGICO DAS PLANTAS

As plantas são detentoras de compostos químicos de grande importância para a humanidade, desde a nutrição até a cura de sintomas e doenças (ISAH, 2019). Parte destes compostos são chamados metabólitos secundários (MS) que são advindos do seu metabolismo secundário (WURTZEL; KUTCHAN, 2016). O metabolismo secundário das plantas garante proteção para seu organismo contra microrganismos, insetos, e raios UV, além da produção de moléculas atrativas para polinizadores, dispersores de herbívoros e que sinalizam para outras plantas (WURTZEL; KUTCHAN, 2016; YANG et al., 2018), garantindo assim a permanência e disseminação de cada espécie (CHOMEL et al., 2016).

A produção de MS é uma conquista evolutiva das plantas. Por se tratarem de organismos sésseis elas necessitam de mecanismos para garantir proteção, assim, a composição de metabólitos secundários e biomassa é influenciada por fatores climáticos, sazonais, temperatura, luz, umidade e condições bióticas ou abióticas (ISAH, 2019). Por isso a Caatinga, um domínio fitogeográfico exclusivamente brasileiro com condições ambientais extremamente adversas (clima seco, temperaturas altas e escassez de chuva), que abriga vegetais resilientes, adaptados a condições extremas (RODRIGUES et al., 2018). Por isso é alvo de investigações biotecnológicas, a fim de identificar moléculas e combinações que possam trazer melhorias para a sociedade

Os MS apresentam uma grande diversidade química, onde apenas uma pequena porcentagem dela foi estudada (ISAH, 2019; WURTZEL; KUTCHAN, 2016). Estes compostos são classificados em três grupos principais baseados em suas características físico-químicas. Os compostos fenólicos, que são formados pela via do ácido chiquímico, são constituídos por pelo menos um anel aromático, onde há um hidrogênio que pode ser substituído pelo grupamento hidroxila, podendo variar de ácidos fenólicos (moléculas simples) até polímeros complexos (SHITAN, 2016). Os terpenos apresentam unidades formadas por cinco carbonos isoprenóides, sendo o grupo de metabólitos secundários mais diverso e constitui os hormônios, carotenóides, pigmentos, látex e a maioria dos óleos essenciais. São geralmente lipofílicos e têm características voláteis (CHOMEL et al., 2016). Os alcalóides são formados a partir aminoácidos, apresentando pelo menos uma molécula de nitrogênio em sua estrutura química, sendo de baixo peso molecular e se apresentando geralmente na forma cristalina (CHOMEL et al., 2016; WINK, 2008; ZAYNAB et al., 2018).

Os compostos fenólicos são muito conhecidos por suas potenciais atividades anti-inflamatória, antimicrobiana e principalmente antioxidante (GRIS et al., 2011), e por inibir o desenvolvimento de doenças crônicas, como diabetes, câncer e doenças neurodegenerativas (ASADI et al., 2010). Eles podem ser classificados como fenóis simples (cumarinas, ligninas, lignanas, flavonóides) ou polifenóis (taninos condensados e hidrolisáveis), a depender da quantidade de unidades fenólicas. De acordo com Dumitriu e colaboradores (2015) eles têm a capacidade de sequestrar ou inibir espécies reativas de oxigênio, que ocasionam danos às células, ocasionando então os efeitos protetores mencionados.

Os terpenos são os compostos majoritários dos óleos essenciais, um grupo de moléculas voláteis, que fornecem aromas, sabores e proteção contra herbívoros e microrganismos, sendo assim potentes inseticidas e antimicrobianos (MANLEY, 2011). Este grupo de moléculas não apresentam valor nutricional, porém muito estudos têm sido feitos, a fim de testar, principalmente, seus efeitos antimicrobianos (DE OLIVEIRA-JÚNIOR et al., 2018; DING et al., 2019) De acordo com Souza e colaboradores (2020) os terpenos têm efeitos anti-inflamatório, gastroprotetor, antineoplásico e antimetastático.

Os alcalóides possuem uma ampla variedade de estruturas químicas e atividades biológicas. Alguns medicamentos utilizados hoje, são inspirados nos alcalóides, como por exemplo a morfina, o taxol e a vincristina, que são respectivamente um analgésico e os dois últimos, agentes anticânceres (DE-LA-CRUZ CHACÓN; GONZÁLEZ-ESQUINCA; GONZALEZ-ESQUINCA, 2012). De acordo com Jin e colaboradores (2014), os alcalóides apresentam ainda potencial imunestimulador, anti-inflamatório e ansiolítico.

2.3 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE ATRIBUÍDA ÀS PLANTAS MEDICINAIS

Os radicais livres são átomos ou moléculas que possuem elétrons livres não pareados em sua órbita mais externa, sendo eles muito instáveis e com alta reatividade. Eles são naturalmente produzidos pelo nosso organismo em baixas quantidades, através de várias reações metabólicas que ocorrem no citoplasma e mitocôndrias. Quando em excesso, podem reagir com proteínas, lipídeos, carboidratos e DNA provocando então danos celulares, sendo um dos principais

responsáveis pelo envelhecimento e morte celular (VASCONCELOS et al., 2014). Por isso é necessário que o organismo além de produzir as espécies reativas, produzam também agentes antioxidantes. Caso contrário, pode haver o desenvolvimento de enfermidades degenerativas, tais como, doenças cardiovasculares, endócrinas e oncológicas (WOLPE SIMAS; RANZOTI; PORSCH, 2019).

Vários fatores podem influenciar para o desenvolvimento de espécies reativas de oxigênio (EROs) e de nitrogênio (ERNs) no organismo, bem como a idade, hábitos alimentares, desidratação, atividades físicas de forma desproporcional, tabagismo, consumo exagerado de gorduras e açúcares, exposição a luz solar sem as devidas proteções e algumas reações inflamatórias. Da mesma forma alguns hábitos também reduzem a quantidade desses agentes reativos, como alimentação saudável, correta ingestão de líquidos, prática de exercícios físicos, consumo de frutas e outros agentes antioxidantes; evitando assim o envelhecimento precoce e o desenvolvimento de doenças degenerativas (CRISTÓVÃO et al., 2013)

A utilização de compostos antioxidantes não combate as doenças, mas ajuda a preveni-las. Dentre os compostos antioxidantes, os que o organismo necessita para combater esses agentes oxidantes estão a cisteína, ácido ascórbico, flavonóides e vitamina K, que podem ser adquiridos através da alimentação (SIES, 1993). As plantas merecem especial atenção, pois, possuem compostos fenólicos, flavonóides, carotenóides e vitaminas, que são excelentes agentes antioxidantes (GOMES DE MELO et al., 2010).

Algumas plantas nativas da Caatinga têm sido estudadas, a fim de definir seus potenciais antioxidantes. Frutos da *Ximenia americana*, por exemplo, apresentam atividade antioxidante, provavelmente relacionada aos polifenóis, flavonoides e antocianinas identificados nestes frutos em diferentes estágios de maturação (ALMEIDA et al., 2016). Um estudo com óleo extraído das sementes da *Cnidocolus quercifolius*, também mostrou elevada atividade antioxidante por métodos *in vitro*, que também pode ser justificado pela presença de ácido gálico e compostos fenólicos em sua composição (SANTOS et al., 2017).

2.4 CAATINGA: ASPECTOS SOCIOECONÔMICOS E ETNOBOTÂNICOS

O Brasil é um país com muitas culturas de várias origens, trazendo consigo uma riqueza significativa de conhecimentos populares. Além disso, representa aproximadamente 20% da biodiversidade mundial, com espécimes distribuídas em 6 regiões fitogeográficas: Amazônia, Cerrado, Mata Atlântica, Caatinga, Pampa e Pantanal. A Caatinga é uma floresta tropical seca, com altas temperaturas e elevada incidência de luz, compreendendo a 11% do território brasileiro abrangendo aproximadamente 844,453 km² distribuído entre oito estados do Nordeste (Pernambuco, Bahia, Ceará, Piauí, Rio Grande do Norte, Paraíba, Alagoas, Sergipe) e Minas Gerais. É um domínio exclusivamente brasileiro, com clima semiárido, extensos períodos de seca, com índice de chuva entre 300 e 800 mm/ano (LEAL; TABARELLI; DA SILVA, 2003).

A Caatinga é considerada o terceiro maior bioma do país e a maior floresta tropical sazonalmente seca desde o México até a Argentina. O termo tem origem do tupi guarani e significa mata branca, por apresentar-se com aspecto seco na maior parte do ano (ARAÚJO FILHO, 2013). O clima predominante é o semiárido, os solos são rasos, secos e pouco nutritivos, arenosos e pedregosos. A altitude varia em 400m, onde as principais cadeias montanhosas são a Borborema, Ibiapaba e Araripe que ultrapassam 800m, e a Chapada da Diamantina que ultrapassa os 1200m. O índice de chuva varia de 1000 mm por ano nas regiões mais próximas do cerrado a 400 mm nas áreas mais secas. (SILVA; SOUZA, 2018)

Por apresentar diferentes formações vegetais é conhecida popularmente por vários nomes, como Sertão, Seridó, Agreste, Carrasco e Cariri, uma diversidade fruto de diferentes áreas geomorfológicas, climas, topografias e influência do homem no meio (ARAÚJO FILHO, 2013; MAIA et al., 2017). A vegetação predominante é de plantas xerófilas, pequenas árvores, arbustos e plantas suculentas, geralmente perenifólias ou com outras adaptações às condições adversas do ambiente, como a presença de folhas pequenas ou folíolos, espinhos, acúleos, folhas onduladas e estômatos na parte côncava da folha, que ajuda a reter água (FERNANDES; QUEIROZ, 2018).

Ela é considerada a maior floresta de clima semiárido, ocupada de forma rarefeita e possui grande biodiversidade e índice de endemismo elevado quando comparado a domínios com características semelhantes (SPERLE DA SILVA; MADUREIRA CRUZ, 2018). De acordo com Zappi et al (2015), 19,7% das 4657 plantas com sementes presentes na Caatinga, 913 são endêmicas. Apesar da grande

diversidade e extensão, estudos mostram que a Caatinga vem sendo altamente destruída ao longo dos anos. De acordo com Beuchle (2015) a Caatinga perdeu 37068 Km² de sua flora entre 1990 e 2010. Em cenário global, encontra-se em situação preocupante, pois a aridificação do ambiente e desertificação da caatinga é uma possibilidade (SANTOS et al., 2016; SPERLE DA SILVA; MADUREIRA CRUZ, 2018). De acordo com Leal, Tabarelli e Silva (2003) é o domínio menos conhecido e estudado do Brasil, isso acaba intensificando o problema, pois dificulta o desenvolvimento de práticas sustentáveis e utilização consciente dos ecossistemas.

O nordeste brasileiro é uma região com alto índice de pobreza, onde há um baixo nível de assistência de saúde e alto índice de desnutrição e habitação precária, o que torna o bioma extremamente importante para as pessoas que ali habitam (ALVAREZ; OLIVEIRA, 2013). De acordo com Bezerra et al. (2013) isso justifica o alto nível de extrativismo da região, o que torna necessário e urgente conhecer as plantas que ali são utilizadas na medicina, na alimentação e para outros fins, para além de garantir eficiência e segurança, fornecer meios para que a flora seja utilizada de forma sustentável. Os recursos madeireiros e não madeireiros para as populações mais rurais do Nordeste têm grande importância econômica, porém isso está associado ao extrativismo da região que vem ocasionando o desmatamento e perda da biodiversidade da caatinga (SILVA et al., 2017).

Para as pessoas desta região, as plantas muitas vezes são a única alternativa terapêutica farmacológica. Com isso, as comunidades da caatinga possuem um vasto conhecimento sobre as propriedades terapêuticas das plantas da região. Como exemplo, a *Pseudobombax marginatum*, conhecida popularmente como embiruçu e é utilizada para tratar úlceras, insônia, gastrite e inflamações (AGRA et al., 2007); *Selaginella convoluta*, conhecida como jericó, utilizada pelas comunidades como antidepressivo, afrodisíaco, diurético, analgésico e anti-inflamatório (SÁ et al., 2012)

Muitas plantas têm sido estudadas recentemente quanto a sua composição química e atividades biológicas. Da Costa Cordeiro e colaboradores (2018) identificaram ácido gálico e hiperosídeo, evidenciando a ação antifúngica contra *Candida albicans* e *C. glabrata*, além de sua atividade antioxidante. Martins e colaboradores (2020), relataram os efeitos anti-inflamatórios do óleo essencial de *Croton rhamnifolioides*, em baixas concentrações. Sendo assim, é necessário conhecer a fundo os efeitos farmacológicos das plantas e seus efeitos toxicológicos.

2.5 EFEITOS TOXICOLÓGICOS DAS PLANTAS

Ao contrário do que muitos pensam, as plantas podem apresentar efeitos tóxicos ao organismo. Por se tratarem de produtos de origem natural, a necessidade de avaliação dos seus efeitos tóxicos muitas vezes é negligenciada, colocando em risco a saúde da população (POSADZKI, et al., 2013). Existe no mundo uma considerável parcela de pessoas que são afetadas por intoxicação devido ao mau uso de plantas medicinais. O Brasil representa o oitavo lugar no ranking mundial de ocorrências de intoxicação por plantas (BALTAR et al., 2016).

As restrições quanto ao uso e comercialização de fitoterápicos têm se intensificado, sendo necessários estudos mais aprofundados e principalmente sobre os possíveis efeitos tóxicos. A ausência dessas investigações cria barreiras sobre o melhor aproveitamento das plantas e seus derivados para o uso como alternativa terapêutica (TUROLLA; NASCIMENTO, 2006). Sendo assim, a Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) recomenda que sejam feitas investigações não clínicas (experimentação animal) e clínicas (avaliação em humanos), para regulamentar a utilização de determinados compostos.

Dentre as avaliações não clínicas podemos citar o ensaio de toxicidade oral aguda (OECD, 2002), onde o animal recebe uma dose única de um determinado composto e é avaliado no decorrer de quatorze dias; o ensaio de toxicidade subaguda (OECD, 2008), em que o animal recebe doses específicas diárias no decorrer de 28 dias; o teste de toxicidade crônica (OECD, 2018), em que os animais são expostos ao tratamento no decorrer de seis a vinte e quatro meses; e o teste de toxicidade subcrônica, em que os animais são tratados no decorrer de três meses (OECD, 1998). No decorrer da administração dos produtos os animais são avaliados quanto à sua condição motora, fisiológica, mortalidade e parâmetros bioquímicos, fisiológicos e patológicos, para definir com mais precisão os efeitos do produto sobre o organismo (VALADARES, 2006; BRASIL, 2010).

Há ainda, ensaios para verificar a ocorrência de danos moleculares, como o teste de mutagenicidade, feito através do ensaio cometa (OECD, 2016a), que avalia os níveis de mutações ocasionadas nos cromossomos ou genes do organismo. A genotoxicidade é avaliada através da ocorrência de micronúcleos (OECD, 2016b), que indica danos causados ao cromossomo em diferentes fases da célula.

Quando o organismo ingere um composto por via oral, ele é absorvido pelo sistema digestório e é direcionado para o fígado, onde irão ocorrer vários processos metabólicos de transformação. Desta forma, Bunchorntavakul e Reddy (2013), alertam para a utilização de compostos de origem natural sem a devida segurança comprovada, pois, estão entre os principais causadores de doença hepática crônica no mundo, quando utilizados de forma indiscriminada. A hepatotoxicidade leve é caracterizada por um aumento dos níveis de alanina aminotransferase (ALT) ou fosfatase alcalina, se o estresse é persistente, a doença pode agravar-se gerando alterações patológicas no tecido hepático (SEEFF, 2007).

Os rins, são órgãos metabólicos importantes também estando entre os principais órgãos afetados pelo consumo indiscriminado de produtos naturais e drogas (devido à excreção dos metabólitos do metabolismo de primeira passagem), ocasionando então a nefrotoxicidade, que são danos acometidos a sua unidade morfofuncional, o néfron, podendo evoluir para insuficiência renal crônica (XU, 2020). Desta forma, são extremamente necessários estudos sobre toxicidade de produtos naturais em órgãos importantes do organismo, visto que muitos destes produtos são utilizados sem as devidas comprovações.

2.6 COMMIPHORA LEPTOPHLOEOS

A *Commiphora leptophloeos* é uma planta endêmica do Brasil, pertencente à família Burseraceae, conhecida popularmente como umburana de cambão, umburana, imburana brava, imburana do sertão e imburana (JÚNIOR; LADIO; ALBUQUERQUE, 2011). Seu nome popular originou-se do tupi, uma linguagem indígena, e significa falso Umbu, devido às características do seu fruto (CARVALHO, 2008). Apresenta distribuição intermediária na caatinga, onde é mais amplamente encontrada. É utilizada na medicina popular para tratar inflamações, feridas, doenças intestinais, respiratórias, gripes, tosses, bronquites, disфонia, cólica, diarreia, antiemético, tônico e infecções renais (AGRA et al., 2007; CARTAXO; DE ALMEIDA SOUZA; DE ALBUQUERQUE, 2010; DE ALBUQUERQUE et al., 2007; TRENTIN et al., 2011). Pode ser encontrada em todos os estados do Nordeste e em Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e Minas Gerais (CARVALHO, 2008).

É uma planta arbórea, decídua, podendo atingir 12 metros de altura com copa grande e irregular. O tronco é tortuoso, forte e pode chegar a medir 60 cm de diâmetro, com casca espessa e coloração que pode variar entre verde e vermelha. As folhas são alternas, imparipinadas e compostas. Sua inflorescência apresenta-se em panículos axilares, com flores verdes claro e bem pequenas (3mm), e fornecem pólen e néctar para abelhas. Os frutos são quadrupóides, verdes, pequenos (diâmetro de 1,5cm) e comestíveis quando bem maduros (MAIA, 2004; CARVALHO, 2008; PAREYN; ARAÚJO; DRUMOND, 2018).

A *C. leptophloeos* é considerada uma espécie vegetal de grande valor cultural, econômico e científico, e devido a isso há uma cultura local de preservar a espécie, impedindo o corte ou queima dela para manter o equilíbrio ecológico com outras espécies, como as abelhas, por exemplo (FEITOSA FERRAZ et al., 2012; GOMES, 2019). De acordo com De Araújo et al. (2017), ela tem capacidade de colonizar espaços com alta incidência de luz e baixa umidade, o que a torna essencial para a manutenção da biodiversidade na Caatinga. Além do seu valor ecológico, ela também é importante para várias atividades cotidianas do homem. É utilizada para fins medicinais, na fabricação de peças artesanais, na infraestrutura das casas e cercados, e é utilizada como fonte carvão (LUCENA; SOARES; NETO, 2012).

Sua grande importância ecológica está relacionada a seus tecidos vegetais, pois suas folhas verdes ou secas, servem como forragens para animais, seus frutos são comestíveis quando maduros principalmente por animais como o *Tropidurus semitaeniatus*, *Sapajus libidinosus*, além de seu tronco servir como abrigo para algumas espécies de abelhas sem ferrão (*Meliponinae*) para construção de ninhos (RIBEIRO; GOGLIATH; FREIRE, 2007; DE MORAES; DA SILVA SOUTO; SCHIEL, 2014; MARTINS et al., 2004).

Alguns estudos têm sido feitos com a *C. leptophloeos* a fim de elucidar seu potencial etnofarmacológico. O óleo essencial extraído de suas folhas, foi avaliado por Da Silva et al (2015), apresentando efeito importante contra a oviposição do *Aedes aegypti*, os autores atribuíram esta possível atividade à presença de cariofileno, linalol, 1,8-cineol, geraniol e geranial. A planta também apresentou atividade antibacteriana e anti-biofilme, em estudos *in vitro* utilizando cepas de *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus* e *Klebsiella pneumoniae*, além de ação contra os fungos *Aspergillus* sp. e *Candida albicans* (DE SOUZA PEREIRA et al., 2017; TRENTIN et al., 2011, 2013).

De Souza Pereira e colaboradores (2017) relatam a presença de ácido gálico, protocatecuico e clorogênico, além da hinoquinina, uma importante lignana, em extrato de clorofórmio da casca. Outros autores também encontraram orientina, iso-orientina, vitexina, isovitexina, isoquercetrina e quercetrina, em extrato hidroetanólico das folhas (DANTAS-MEDEIROS et al., 2021a). Esses dados, contribuem de forma significativa para o entendimento das atividade farmacológicas atribuídas à planta pela população do nordeste, pois esses compostos são conhecidos por suas ações anti-inflamatórias e antioxidantes.

Dantas-Medeiros et al. (2021a), descrevem ainda atividade anti-inflamatória do extrato hidroetanólico das folhas da *C. leptophloeos* em camundongos por meio do edema de pata induzido por carragenina e modelos de bolsa de ar induzido por zimosan. Os autores relataram diminuição do infiltrado leucocitário, níveis de mieloperoxidase, interleucina 10 e TNF-alfa. Pessoa et al. (2021), também realizaram estudos em camundongos, demonstrando efeitos antidiarreicos do extrato etanólico das folhas, que ocorreu através de alterações da motilidade intestinal. Ambos os trabalhos relataram a segurança da planta através da toxicidade oral aguda *in vivo*, não apresentando mortalidade, alterações fisiológicas e nem bioquímicas.

3 RESULTADOS

Os resultados dessa dissertação estão apresentados na forma de artigo(s).

3.1 ARTIGO – PERFIL FITOQUÍMICO, SEGURANÇA TOXICOLÓGICA, GENOTÓXICA, MUTAGÊNICA, CITOTÓXICA E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS AQUOSOS DA *Commiphora leptophloeos* (MART.) JB GILLETT

Perfil fitoquímico, segurança toxicológica, genotóxica, mutagênica, citotóxica e atividade antioxidante dos extratos aquosos da *Commiphora leptophloeos* (Mart.) JB Gillett

Lucas Felipe de Melo Alcântara²; Pedro Thiago da Silva¹; Talita Giselly dos Santos Souza²; Marlllyn Marques da Silva²; George Souza Feitoza¹; Wendeo Kennedy Costa¹; Maria Aparecida da Conceição de Lira²; Cristiano Aparecido Chagas²; Francisco Carlos Amanajás de Aguiar Júnior²; Maria Tereza¹; Márcia Vanusa da Silva¹.

¹ Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.

² Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco, Vitória de Santo Antão, Pernambuco, Brasil.

Correspondência do autor:

Lucas Felipe de Melo Alcântara

Rua Alto do Reservatório, s/n – CEP: 55608-680 - Bela Vista, Vitória de Santo Antão, PE – Brasil.

Fone/Fax: (00 55 81) 35233351

E-mail: lalcantara102@gmail.com

Resumo

Relevância etnofarmacológica: A *Commiphora leptophloeos* é uma planta endêmica brasileira, utilizada popularmente como anti-inflamatório, cicatrizante e para tratar doenças intestinais e respiratórias.

Objetivo: Descrever o perfil fitoquímico, relatar a segurança toxicológica, genotóxica e mutagênica *in vivo* e atividade antioxidante *in vitro* dos extratos aquosos das cascas e folhas da *C. leptophloeos*

Materiais e métodos: As cascas e folhas da planta foram coletadas na cidade de Buíque, Pernambuco, Brasil e feita a preparação dos extratos aquosos (EAQ). A análise fitoquímica foi realizada através da técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), em seguida foram determinados os compostos fenólicos, utilizando como curva padrão o ácido gálico (AG); e flavonoides, utilizando como curva padrão a quercetina (Q); e a avaliação da atividade antioxidante pelo método do radical de eliminação DPPH e fosfomolibdênio. A citotoxicidade foi verificada por meio da viabilidade celular em macrófagos (J774.A1) e células de adenocarcinoma humano da glândula mamária (MDA-MB-231) pelo método MTT. A toxicidade oral aguda (TA), genotoxicidade (GE) e mutagenicidade (MU), realizados em camundongos (*Mus musculus*), que receberam por via oral os EAQ (2g/Kg). No TA, os animais foram observados no decorrer de 14 dias, ao fim foram eutanasiados e coletados sangue para análise bioquímica e rins, fígado e baço para análise histomorfológica. Além disso, foram coletados coração, pulmões e tireóide que foram apenas pesados. A GE e a MU foram verificadas no sangue dos animais coletados 6h e 48h após a administração dos EAQ, por meio do teste de micronúcleo e ensaio cometa, respectivamente.

Resultados: Foram identificados no extrato aquoso da casca (EAQC) o ácido gálico, catequina e epicatequina; no extrato aquoso da folha (EAQF), o ácido clorogênico. Ambos apresentaram elevado teor de compostos fenólicos e flavonóides e potencial antioxidante significativo. Não apresentaram efeitos negativos na viabilidade celular nem nos experimentos *in vivo*. Não houve morte dos animais nem alterações comportamentais, e o ganho de massa corporal foi semelhante em todos os grupos do TA. Nenhum dos órgãos pesados apresentaram alteração na massa, e os rins, fígado e baço também não apresentaram alterações histopatológicas ou histomorfométricas. A análise bioquímica do sangue não apresentou diferenças nos padrões enzimáticos. No ensaio cometa e teste de micronúcleo não houve alterações.

Conclusão: Os EAQ tem potencial antioxidante *in vitro* e são ricos em polifenóis e flavonóides, bem como não apresentaram efeitos toxicológicos nos testes da TA a

nível comportamental, morfológico e bioquímico, nem alterações genotóxicas e mutagênicas em camundongos na concentração testada.

Palavras-chave: Burseraceae, Amburana de cambão, toxicologia, mutagênese, caatinga, medicina tradicional.

1 Introdução

A *Commiphora leptophloeos* é uma planta brasileira endêmica da Caatinga (domínio fitogeográfico localizado no nordeste do país), onde o clima é semiárido (SILVA et al., 2017). Apresenta um valor sociocultural importante na região, pois é utilizada como madeira para construir cercados, no artesanato, como lenha e para fins medicinais (FEITOSA FERRAZ et al., 2012; GOMES, 2019). Seus efeitos medicinais são descritos pela população local como cicatrizante, anti-inflamatório, antitérmico, analgésico, anti-microbiano, e para tratar doenças do trato respiratório e digestivo (ALBUQUERQUE et al., 2007).

Recentes estudos têm mostrado, que tanto suas folhas como a casca possuem componentes importantes para a indústria farmacêutica e biotecnológica. Da Silva (2015), mostra que o óleo extraído de suas folhas possui 46 constituintes, dentre eles, os principais encontrados foram hidrocarbonetos sesquiterpênicos e monoterpênicos. Em extratos etanólico e hidroetanólico das folhas, viu-se elevada quantidade de flavonoides, em especial flavonóides C-glicosilados, como: isoorientina, orientina, vitexina quercetrina e isoquercitrina (PESSOA et al., 2021; DANTAS-MEDEIROS et al. 2021a). Cordeiro et al. (2021) identificou diglicosídeos de rutina, vitexina e quercetina em extratos hexânico, clorofórmico, etanólico, metanólico e aquoso das folhas. E o extrato clorofórmico da casca possui compostos fenólicos, como o ácido gálico, clorogênico, protocatecuico e clorogênico, além da hinoquinina que é uma lignana (DE SOUZA PEREIRA et al., 2017).

Testes experimentais mostram que diferentes extratos das folhas da *C. leptophloeos* apresentam efeitos anti-diarreico (PESSOA et al., 2021) e anti-inflamatório em camundongos (DANTAS-MEDEIROS et al., 2021a), atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo* em *Caenorhabditis elegans* (CORDEIRO et al., 2021), e seu óleo possui efeitos negativos na oviposição do *Aedes aegypti* (DA SILVA et al.,

2015). Além disso, extratos da casca da *C. leptophloeos* mostram-se eficazes contra algumas bactérias multirresistentes, como a *Staphylococcus aureus*, e fungos, como o *Aspergillus sp* (DE SOUZA PEREIRA et al., 2017), e também apresenta efeitos contra a formação de biofilmes (TRENTIN et al., 2013).

Desta forma, a *C. leptophloeos* mostra-se como um importante recurso etnobotânico e etnofarmacológico para a sociedade. Sendo necessários estudos que venham além de apresentar efeitos biológicos e farmacológicos. Sendo assim, o objetivo deste trabalho é apresentar a segurança toxicológica de extratos aquosos da casca e folhas da *C. leptophloeos*, bem como relatar sua composição química e atividade antioxidante.

2 Materiais e métodos

2.1 Obtenção do material vegetal e preparação dos extratos aquosos da *C. leptophloeos*

As cascas e folhas da *Commiphora leptophloeos* (Mart.) JB Gillett foram coletadas no Vale do Catimbau na cidade de Buíque, Pernambuco – Brasil, em março de 2019, sob autorização do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (SISBIO 16806). Os exemplares da planta foram depositados no herbário do Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA) com o número de referência 84 037.

O material *in natura* foi colocado em estufa com corrente de ar na temperatura de 45°C no período de 72 horas para secagem total. Posteriormente, triturado em e 100g do pó foram utilizados para preparação do extrato, na proporção de 1g para 10 mL de água destilada. A mistura foi agitada em agitador magnético em temperatura ambiente por 24 horas, em seguida filtrado e resfriado a -4°C. Posteriormente liofilizado para obtenção dos extratos brutos em pó da casca (EAQC) e folhas (EAQF). Os extratos foram armazenados em um dessecador até a realização dos experimentos.

2.2 Perfil fitoquímico e atividade antioxidante dos extrato aquosos da *C. leptophloeos*

2.2.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

As análises cromatográficas foram feitas em equipamento Agilent 1260 Infinity com bomba quaternária e degaseificador (G1311D), injetor automático (G1329B),

forno de coluna (G1316A), detector DAD (G4212B), e coluna Zorbax® (Agilent), SB-C18 5µm; 4,6 x 250mm com pré coluna Zorbax ® (Agilent) SB-C18 5µm e 4,6 x12,5mm.

Os extratos (5 mg/mL) foram dissolvidos em metanol (MeOH), grau HPLC, em seguida as misturas foram filtradas com membrana de 0,22 µm e analisada seguindo um gradiente linear de 92% (A) a 65% (A), no período de de 0 a 15 minutos a 30°C, com fluxo de 2,4 mL/min utilizando como fase móvel água ultra (Mili-q) pura acidificada a 0,3% com ácido acético (A) e Acetonitrila grau HPLC (Sigma-Aldrich®) (B) com detecção completa entre 190-400nm.

Este método foi alcançado por meio de um método exploratório visando identificar 12 padrões de compostos fenólicos e flavonóides: ácido gálico, ácido elágico, ácido trans-ferulico, ácido p-hidroxibenzoico, ácido cinâmico, ácido clorogênico, ácido p-cumárico, ácido cafeico, catequina, epicatequina, rutina e quercetina. Tendo como evento de integração: Cromatograma 254nm; Threshold 1e+006 (0 – 15 min); Width 0.3 (0 – 15 min).

2.2.2 Determinação de fenólicos totais

O teor de fenólicos foi determinado através do ensaio de Singleton e Rossi (1965), com adaptações. 20 µL de cada extrato (EAQC e EAQF) foram acrescentados à 100 µL do reagente de Folin-Ciocalteu (1:10) em triplicata por 3 minutos; em seguida, foi adicionada uma solução de carbonato de cálcio a 7,5% (p/v). Após 2 horas de incubação sob abrigo de luz em temperatura ambiente, foram feitas as leituras das absorvâncias no comprimento de onda à 735 nm. Uma curva padrão de calibração foi feita com ácido gálico, e os resultados foram expressos em miligramas equivalente ao ácido gálico (EAG), por gramas de extrato.

2.2.3 Determinação de flavonoides totais

Este ensaio foi baseado no método de Woisky e Salatino (1998), com adaptações. Foram adicionados 100µL dos extratos em placas de 96 poços e posteriormente adicionados 100µL da solução de ALCL3 a 2%. Após uma hora sob temperatura ambiente e ausência de luz, as absorvâncias foram medidas em um comprimento de onda a 420 nm. Foi utilizada como curva padrão a quercetina, e a quantidade de flavonoides foi expressa como miligramas por grama de extrato.

2.2.4 Atividade antioxidante pelo método DPPH

A atividade antioxidante *in vitro* dos extratos aquosos da casca e folhas foi avaliada via doação de hidrogênio usando o radical livre estável 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH). Todo ensaio foi avaliado em triplicata e atividade de inibição foi calculada em porcentagem de redução do DPPH. A substância padrão utilizada foi um similar da vitamina C (Trolox®). A porcentagem de inibição (I%) foi calculada pela seguinte equação: $I\% = [(Ac-As) / (Ac)] \times 100$, onde Ac é a absorbância do controle e As a absorbância da amostra (BLOUIS, 1958).

2.2.5 Atividade antioxidante total (AAT)

A capacidade antioxidante total foi avaliada pelo método espectrofotométrico pelo ensaio do fosfomolibdênio, determinando a redução de Mo^{4+} para Mo^{5+} , com subsequente formação de fosfato de molibdênio, com absorção máxima em 695 nm (PRIETO; PINEDA; AGUILAR, 1999). O ácido ascórbico (AA) foi utilizado como substância padrão. A AAT foi expressa em porcentagem através da equação: $AAT (\%) = [(Aa - Ab) / (Aa - Ab)] \times 100$, onde Ab absorbância na presença do extrato, Ab é absorbância do controle (branco: sem extrato) e Aa é absorbância do ácido ascórbico.

2.3 Testes de segurança toxicológica dos extratos aquosos da *C. leptophloeos*

2.3.1 Citotoxicidade: linhagens celulares e ensaio de MTT

Foram utilizados macrófagos da linhagem J774.A1 e células de Adenocarcinoma Humano da glândula mamária (MDA-MB-231), ambas obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ). J774.A1 foi cultivada em meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) suplementado com soro fetal bovino (10%) e penicilina- estreptomicina (1%) a 37 °C e 5% de CO₂. Enquanto que a cultura MDA-MB-231 foi mantida em meio de cultura L-15 de Leibovitz e F-12 (proporção de 50% de cada meio) com L-glutamina 2 mM, sem bicarbonato de sódio e soro bovino fetal (10%) com ausência de CO₂. As células foram contadas na câmara de Neubauer para o teste de viabilidade celular.

O teste empregando o 3- (4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) foi utilizado para determinar a viabilidade das células (MOSMANN, 1983). As células foram inseridas em placas de 96 poços, a uma densidade de 1×10^5

(J774) e 1×10^4 (MDA) de células/mL e após 24h de incubação os EAQs foram adicionados nas concentrações finais de 12,5; 25; 50; 100 e 200 µg/mL, e permaneceram por 24h. Após o período de exposição, foram adicionados 25 µL de solução de MTT (5mg/mL), e as placas foram incubadas durante 3h. Posteriormente, o sobrenadante foi removido e 100 µL de DMSO (Dimethylsulfoxide) foram adicionados. A absorbância (Abs) foi medida em Leitor de Microplaca (Biotek Elx808) no comprimento de 630nm. A citotoxicidade foi expressa em viabilidade celular: (Abs da população celular tratada X 100 / Abs da população celular não tratada) (Da Silva et al, 2019).

2.3.2 Animais experimentais

Foram utilizados camundongos albinos swiss (*Mus musculus*) machos (25-40g), com idade aproximada de 60 dias, mantidos em gaiolas de polipropileno com grades inoxidáveis e maravalha como cobertura, à temperatura de $22 \pm 3^\circ\text{C}$, com ciclo claro-escuro de 12h, recebendo ração *ad libitum* balanceada e água. Os protocolos de experimentação foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso Animais (CEEA) da UFPE (n° 102/2019).

2.3.3 Toxicidade oral aguda

Os animais receberam por via oral 2000 mg/Kg de cada EAQ ou água destilada (N=5), seguindo a recomendação da OECD (2002), guia 423, e foram observados no decorrer das duas primeiras horas e posteriormente a cada 24h no durante quatorze dias, a fim de identificar morte, alterações comportamentais, fisiológicas e morfológicas. Os animais foram pesados antes dos experimentos e diariamente, para acompanhar o ganho de massa corporal.

Ao fim do décimo quarto dia, os animais foram eutanasiados com uma sobredose de solução de anestésico (xilazina - 30 mg/kg e cetamina - 30 mg/kg) e feita a coleta do sangue para análise bioquímica; e os rins, fígado, baço, coração, pulmões e tireóide para serem pesados, enquanto apenas os três primeiros órgãos foram submetidos a análise histopatológica e histomorfométrica.

A análise bioquímica foi realizada por meio de kits específicos (Labtest Diagnóstica, Lagoa Santa, Brasil) e um analisador COBAS Mira Plus (Roche Diagnostics Systems, Basel, Suíça), que foi verificado os níveis de alanina aminotransferase, aspartato aminotransferase, fosfatase alcalina, proteínas totais,

uréia, Creatinina, Bilirrubina e triglicerídeos. Os rins, fígado e baço foram dissecados, pesados e preparados para análise histomorfométrica, enquanto o coração, pulmões e tireoide foram apenas dissecados e pesados.

2.3.4 *Análise dos tecidos*

Rins, fígado e baço foram fixados em formaldeído neutro tamponado a 10%, processados em histotécnico, incluídos em parafina histológica, cortados em micrótomo (Leica RM 2245) e as lâminas foram preparadas e coradas com Hematoxilina e Eosina. Posteriormente foram fotografadas em vinte campos de visão utilizando uma câmera (Moticam 3000) acoplada ao microscópio óptico (Nikon E-200) na objetiva de 10x.

As imagens foram analisadas a fim de identificar apoptose, necrose e processos inflamatórios e feita a histomorfometria em software *Image J* (versão 1.8.0_112), no qual foram feitas as mensurações da área do corpúsculo e glomérulo renal; no fígado foi analisada a quantidade de hepatócitos e a área de seus respectivos núcleos. No baço foi analisada a área da polpa branca e polpa vermelha.

2.3.5 *Atividade mutagênica e genotóxica: ensaio cometa e micronúcleo*

Os animais receberam por via oral 2000 mg/Kg de cada extrato, água destilada ou ciclofosfamida (25 mg/Kg) por via intraperitoneal (N=5). Seis horas após a administração, foram coletados 15µl de sangue pela veia caudal utilizando uma seringa de 1mL para a realização do ensaio cometa, seguindo os protocolos de Tice et al. (2000). Em uma sala iluminada apenas com luz vermelha, o sangue foi homogeneizado em 100µl de agarose de baixo ponto de fusão e essa mistura foi adicionada em lâminas previamente recobertas por agarose padrão e adicionadas lamínulas. Em seguida, as lâminas foram armazenadas na temperatura de 4°C por dez minutos, as lamínulas foram retiradas e adicionados em solução de lise (2,5 M NaCl, 100mM EDTA, 10 mM TRIS, 1% Triton X-100, DMSO 10%, com pH 10), onde permaneceram por 48 horas. O material foi então, colocado em solução tampão (1M NaOH e 200 mM sal dissódico EDTA, pH 13) em uma cuba horizontal de eletroforese, em que permaneceu por 20 minutos em corrente ± 300 mA e diferença de potencial de 32V. Após isso as lâminas foram adicionadas durante 15 minutos em tampão Tris-HCl 0,4 M, pH 7,5, para neutralização, posteriormente fixadas por 5 minutos em álcool

absoluto. Por fim, cada lâmina foi corada com 30µL de solução de laranja de acridina (0, 0002%, p/v).

Utilizando um microscópio de fluorescência (*Zeiss-Imager, M2*), com objetiva de 40X e com filtro *Alexa Fluor 546*, foram analisados 100 nucleoides por animal, com observação da relação entre o comprimento da cauda e o tamanho da cabeça do cometa. Para cada nucleoide foi utilizada uma escala de 0 a 4, classificados como: sem danos, pouco dano aparente, dano médio, dano médio com cauda mais longa e dano máximo. Assim, o índice de dano (ID) foi calculado da seguinte forma: $ID\ total = 0(n^\circ\ de\ controle\ classe\ 0) + (n^\circ\ classe\ 1) + 2(n^\circ\ classe\ 2) + 3(n^\circ\ classe\ 3) + 4(n^\circ\ classe\ 4)$. Outro parâmetro analisado foi a frequência de danos (FD), que leva em consideração o número total de nucleoides observados menos a quantidade de nucleoides classificados na escala sem danos, que foi calculado da seguinte forma: $FD = (n^\circ\ total - n^\circ\ classe\ 0)$ (COLLINS et al., 2008; SOUSA COELHO et al., 2018).

Para o teste de micronúcleo, após 48h de sobrevivência, foram coletados 5µl de sangue de cada animal, por punção cardíaca, e depositado em lâminas previamente preparadas com 10µl de laranja de acridina (Biotium - 1mg/mL). Posteriormente, com auxílio de lamínulas, o material foi espalhado uniformemente sobre a lâmina. Foram analisados 2000 eritrócitos policromáticos por animal para quantificar os eritrócitos policromáticos micronucleados (OECD, 2016a,b; HAYASHI et al., 1990). A análise foi realizada em microscópio de fluorescência *Zeiss-Imager M2*, com objetiva de 40X, utilizando o filtro *Alexa Fluor 488*.

2.4 Análise estatística

Todos os resultados foram computados em tabelas e verificados de acordo com a média e desvio padrão (DP), tendo como valor de significância estatística $P < 0,05$. Nos testes de determinação de compostos fenólicos totais, flavonóides e atividades antioxidantes, foi verificada apenas a variância. Os resultados da análise citotóxica estão dispostos como dois experimentos independentes, cada experimento em quadruplicata e foram submetidos a ANOVA seguido pelo Bonferroni. Os dados da análise bioquímica do sangue também foram verificados por meio do ANOVA. A massa dos animais, dos órgãos e da histomorfometria foram analisadas por meio do teste de normalidade (programa Smirnov Kolmogorov), seguido do teste não paramétrico U de Mann-Whitney. Para esses dados foi utilizado o software Graphpad

Prism 9, exceto os dados do ensaio cometa e micronúcleo, que foram submetidos ao teste de Wilcoxon (software R).

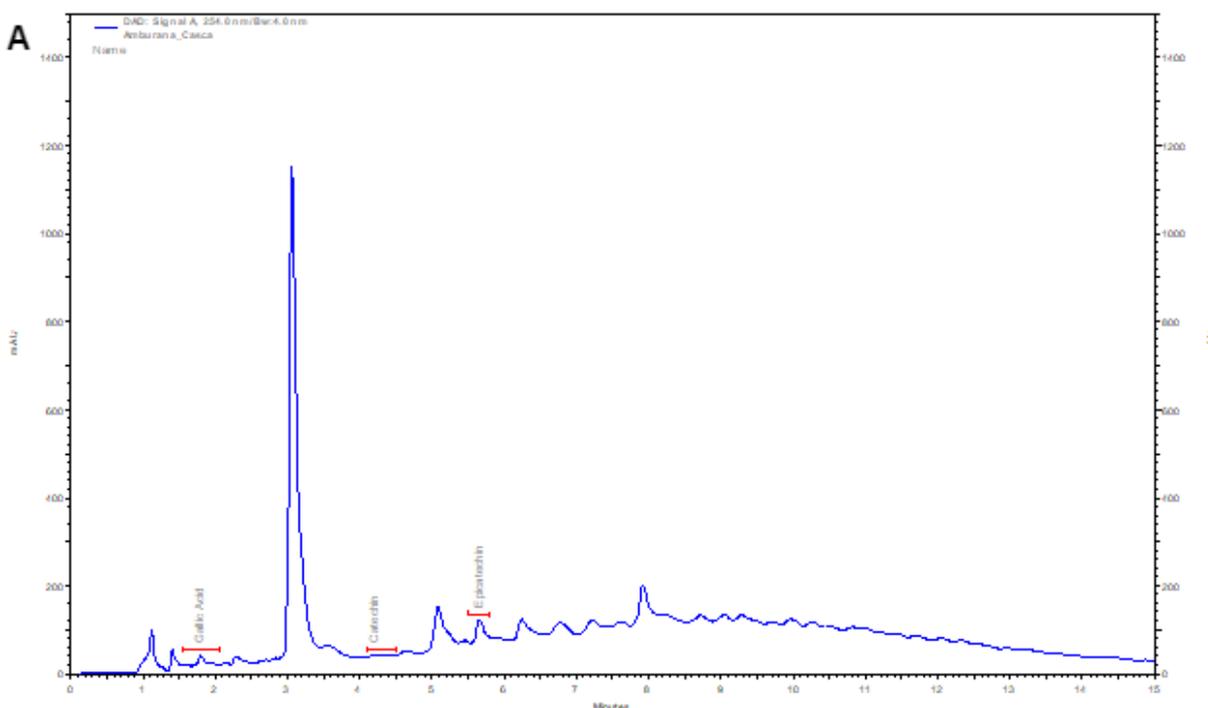
3 Resultados

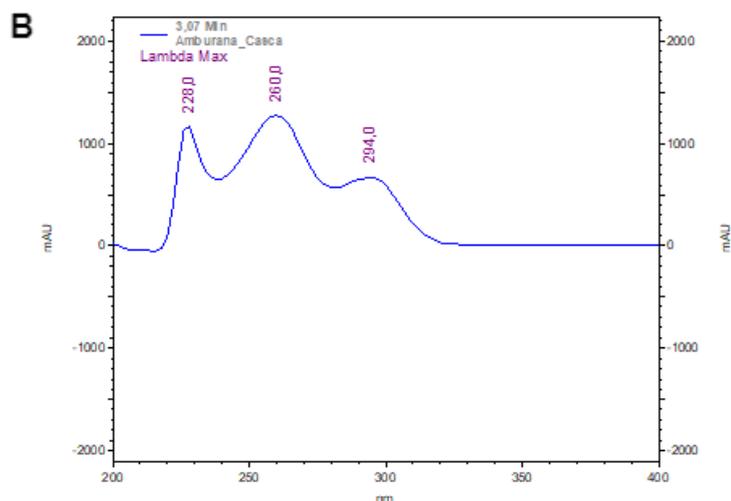
3.1 Perfil fitoquímico e atividade antioxidante dos extrato aquosos da *C. leptophloeos*

3.1.1 Análise por CLAE

Foram identificados no EAQC por tempo de retenção e espectro UV o ácido gálico (AG) com picos de 224 nm e 326 nm, a catequina (CA) com 226 nm e 280 nm, e a epicatequina (EP) com 290 nm e 264 nm (Figura 1). Um composto mostrou-se majoritário no EAQC, mas não foi identificado na análise nem nas publicações da literatura, os espectros e tempo de retenção estão presentes no cromatograma da figura 2. No EAQF foi identificado apenas o ácido clorogênico (FIGURA 3).

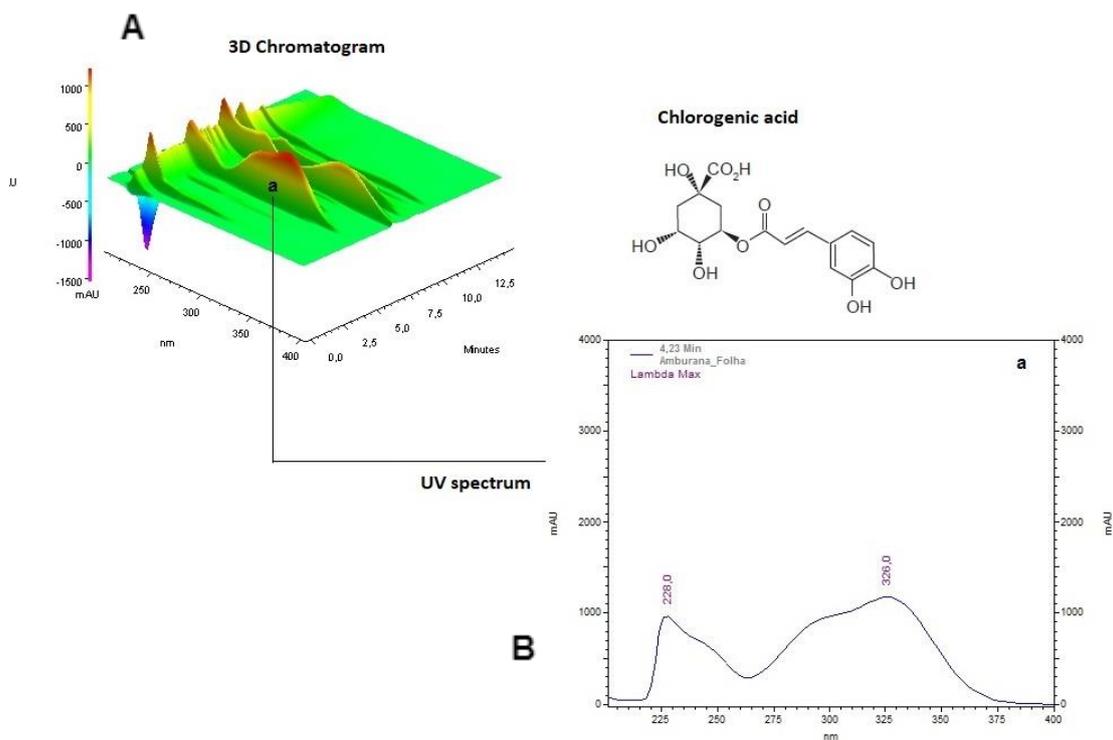
Figura 01: Cromatograma do extrato aquoso da casca da *C. leptophloeos*.





Espectro UV e tempo de retenção do Ácido gálico, catequina e Epicatequina no extrato aquoso da casca da *C. leptophloeos* através da técnica de CLAE (A). Composto majoritário não identificado, com tempo de retenção de 3,07 min e espectro UV com picos entre 228 nm e 294 nm (B).

Figura 02 - Cromatograma do extrato aquoso das folhas da *C. leptophloeos* através da técnica de CLAE.



Cromatograma 3D (A) e espectro UV de 228 nm e 306 nm com tempo de retenção de 4,23 min (B).

3.1.2 Determinação de compostos fenólicos e flavonoides

Os compostos fenólicos totais foram identificados em elevadas quantidades nos dois extratos, sendo o EAQC em maior quantidade (Tabela 1). Os flavonóides também estavam presentes em ambos os extratos, contudo, com maior concentração no EAQF (Tabela 1).

Tabela 01: Determinação de compostos fenólicos totais e flavonóides do extrato da casca e folhas da *Commiphora leptophloeos*.

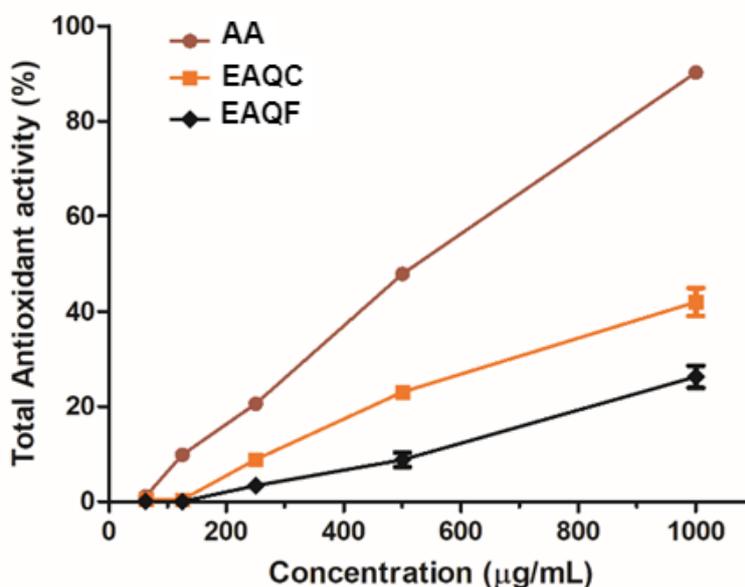
Extratos (1000 µg/mL)	Fenólicos totais (mg.g/ EAG.100g ⁻¹)	Flavonoides (mg.g/EQ.100g ⁻¹)
EAQC	489,7 ± 2	13,6 ± 0,1
EAQF	372,03 ± 23	49,68 ± 1,9

Os dados representam a média das determinações em triplicata ± desvio padrão. EAG: equivalentes de ácido gálico. EQ: equivalente à quercetina. AA: ácido ascórbico. EAQC: Extrato aquoso da casca da *C. leptophloeos*. EAQF: Extrato aquoso das folhas da *C. leptophloeos*.

3.1.3 Capacidade Antioxidante total (CAT)

Todos os extratos apresentaram atividade antioxidante significativa a partir da concentração de 200 µg/mL, mostrando atividade dose dependente até a concentração de 1000 µg/mL, e valores abaixo do Ácido Ascórbico (AA) (Figura 3).

Figura 3 - Gráfico apresentado capacidade antioxidante total dos extratos aquoso da casca e folhas da *C. leptophloeos*.

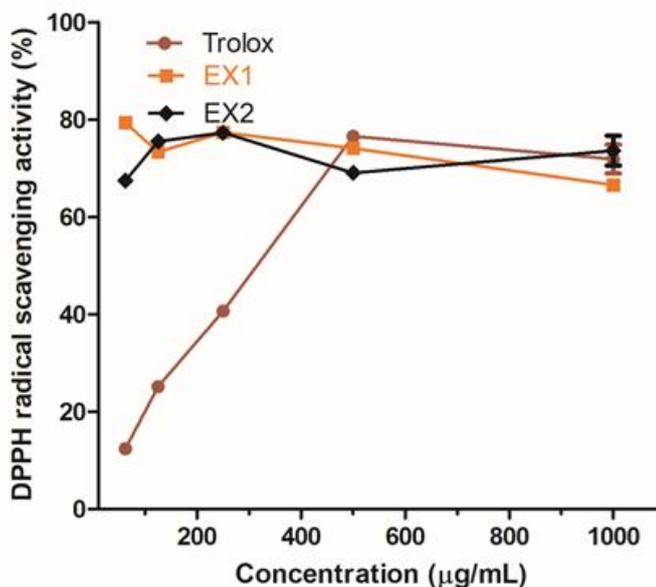


Resultados expressos em % por µg/m. AA: curva padrão o ácido ascórbico. EX1: Extrato aquoso da casca da *C. leptophloeos*. EX2: Extrato aquoso das folhas da *C. leptophloeos*.

3.1.4 Capacidade sequestradora de radicais livres DPPH

Ambos os extratos apresentaram atividade de eliminação de radicais livres de DPPH. O EAQF foi dose dependente nas concentrações mais baixas (de 31,250µg/mL a 500µg/mL) e a partir de 500mg/mL a atividade permaneceu constante entre 70% e 80% (Figura 4). O EAQC, teve alta atividade sequestradora de radicais livres, com início na concentração mínima de 50µg/mL e efetividade acima de 60%, enquanto na concentração de 250µg/mL, alcançou sua atividade antioxidante máxima, próximo aos 80% (Figura 4).

Figura 4: Capacidade sequestradora de radicais livres dos extratos da casca e folhas da *C. leptophloeos*.



Resultados apresentados em % por µg/mL. Trolox: curva padrão. EX1: Extrato aquoso da casca da *C. leptophloeos*. EX2: Extrato aquoso das folhas da *C. leptophloeos*.

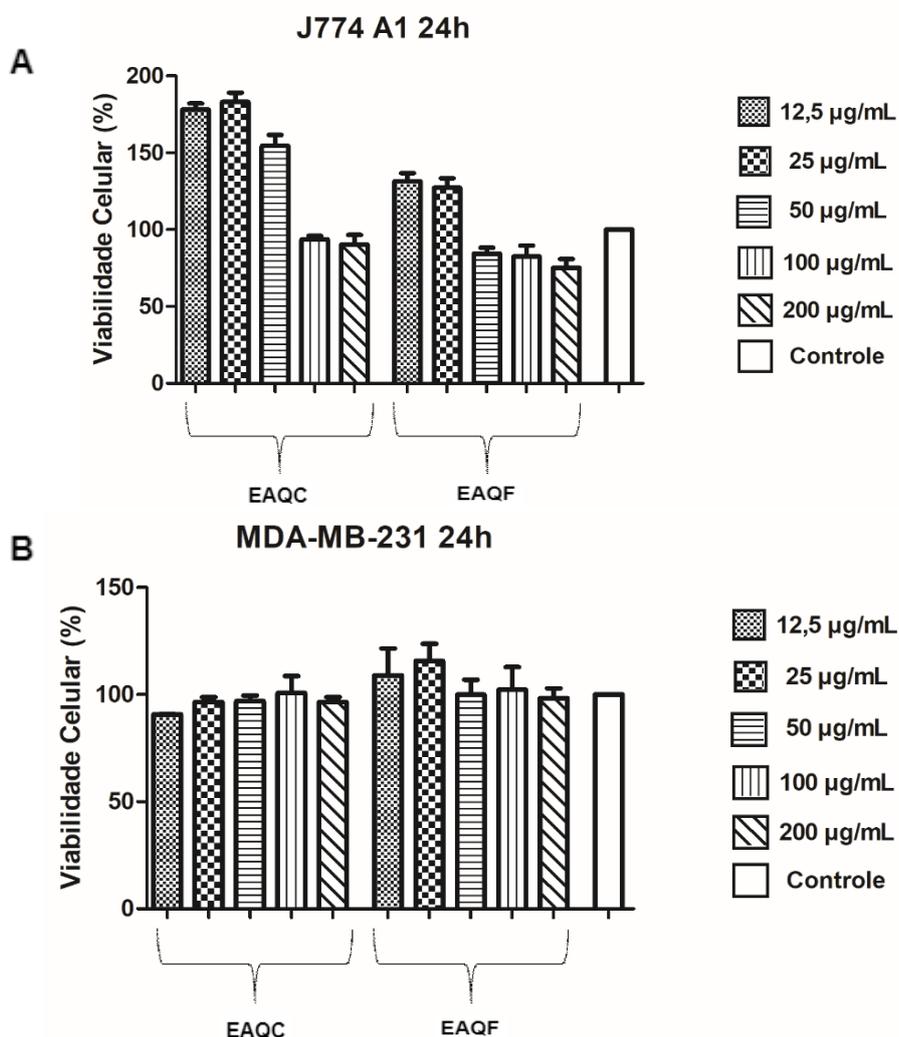
3.2 Testes de segurança toxicológica dos extratos aquosos da *C. leptophloeos*

3.2.1 Citotoxicidade

Os extratos EAQC e EAQF da *Commiphora leptophloeos* não apresentaram efeitos citotóxicos em linhagens de células J774 A1 e MDA (figura 5). Na linhagem de macrófagos (Figura 5A) houve um aumento significativo da viabilidade celular principalmente nas doses mais baixas em ambos os extratos. No EAQC a taxa de células viáveis foi de $131,3 \pm 5,3$ e $127,1 \pm 6,2$ % nas concentrações de 12,5 e 25 µg/mL, respectivamente. Enquanto no EAQF a viabilidade celular foi de $178,1 \pm 3,9$, 183 ± 6 , $154,5 \pm 6,9$ % nas concentrações de 12,5, 25 e 50 µg/mL respectivamente. A viabilidade celular mostrou-se diminuída quando tratadas com o EAQC nas concentrações de 50, 100 e 200 µg/mL, com taxas de viabilidade de $84,4 \pm 3,9$, $82,5 \pm 6,9$ e $75,2 \pm 5,6$ %, respectivamente. E o EAQF não mostrou diminuição na taxa de viabilidade celular das células J744 em nenhuma das doses testadas.

Não houve alterações na viabilidade celular de células MDA tratadas com os extratos aquosos da *C. leptophloeos* em nenhuma dose testada (Figura 5B).

Figura 5: Viabilidade celular das células J744 (A) e MDA (B) tratadas com extratos aquosos da casca e folhas da *C. leptophloeos*.

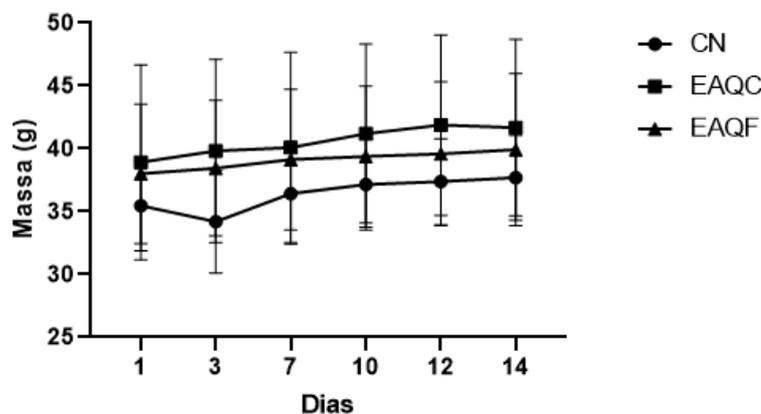


Resultados apresentados em média±DP. As diferenças estatísticas foram determinadas pela ANOVA seguido de Bonferroni. Onde, a: diferença significativa com o controle; b: diferença significativa entre os grupos EX1 e EX2 na concentração de 12,5µg/mL; c: diferença significativa entre os grupos EX1 e EX2 na concentração de 25µg/mL; d: diferença significativa entre os grupos EX1 e EX2 na concentração de 50µg/mL; e: diferença significativa entre os grupos EX1 e EX2 na concentração de 200µg/mL.

3.2.2 Toxicidade aguda

Não houve morte dos animais, alterações comportamentais ou fisiológicas ocasionadas pelos extratos. O ganho de massa corporal manteve-se constante ao longo dos quatorze dias, não apresentando diferença entre os grupos (Figura 8), bem como não houve diferença na massa dos rins, fígado, baço, coração, tireóide e pulmões (Tabela 2).

Figura 8: Massa corporal total dos animais no decorrer dos quatorze dias após a administração dos extratos aquosos da *C. leptophloeos*.



Valores apresentados em média±DP. Dados submetidos ao teste estatístico U de Mann-Whitney. Onde foram comparados os grupos tratados com o grupo controle negativo. CN: controle negativo. EX1: extrato aquoso da casca da *C. leptophloeos*. EX2: extrato aquoso das folhas da *C. leptophloeos*.

Tabela 2: Massa dos rins, fígado, baço, coração, pulmões e tireoide dos animais ao fim do décimo quarto dia após a administração dos extratos da casca e folhas da *C. leptophloeos*.

	CONTROLE	EAQC	EAQF
Rins	0,68 ± 0,059	0,72 ± 0,2	0,72 ± 0,14
Fígado	2,138 ± 0,202	2,268 ± 0,811	2,223 ± 0,513
Baço	0,234 ± 0,118	0,35 ± 0,162	0,242 ± 0,049
Coração	0,232 ± 0,072	0,252 ± 0,042	0,247 ± 0,068
Pulmões	0,256 ± 0,028	0,257 ± 0,022	0,242 ± 0,011
Tireoide	0,32 ± 0,048	0,347 ± 0,066	0,327 ± 0,061

Valores apresentados em média±DP. Dados submetidos ao teste estatístico U de Mann-Whitney. Onde foram comparados os grupos tratados com o grupo controle negativo, $P > 0,05$. CN: controle negativo. EX1: extrato aquoso da casca da *C. leptophloeos*. EX2: extrato aquoso das folhas da *C. leptophloeos*.

3.2.3 Análise Bioquímica do sangue

Não houve alterações bioquímicas na composição sorológica do sangue dos camundongos (Tabela 3). Os níveis de albumina, alanina aminotransferase, aspartato aminotransferase, fosfatase alcalina, proteínas totais, bilirrubina, colesterol total, triglicerídeos, ureia e creatina mostraram-se normais.

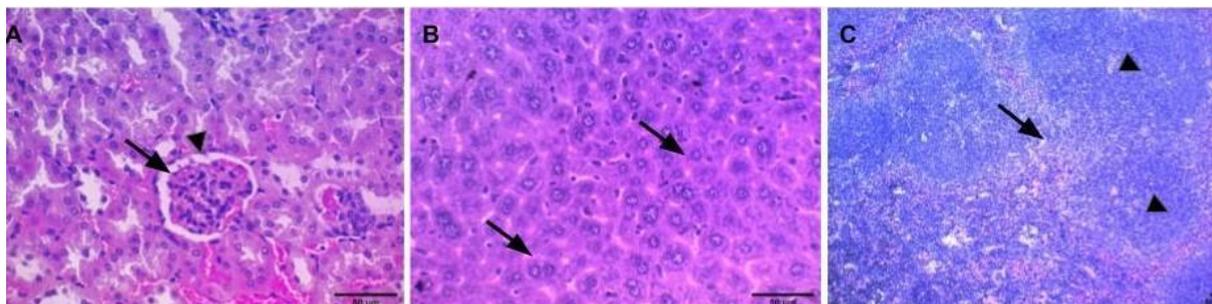
Tabela 4: Parâmetros bioquímicos do soro sanguíneo dos camundongos após quatorze dias da administração dos extratos aquosos da casca e folhas da *C. leptophloeos*.

Parâmetro	CN	EAQC	EAQF
Albumina (g/dL)	4,33±0,34	4,66±0,76	4,75±0,43
Alanina aminotransferase (U/L)	91,33 ± 3,09	83,78 ± 3,01	95,46 ± 3,93
Aspartato aminotransferase (U/L)	63,44 ± 2,13	56,90 ± 1,68	46,70 ± 4,18
Fosfatase alcalina (U/L)	123,76 ± 2,93	123,30 ± 4,51	117,41 ± 4,71
Proteína total (g/dL)	6,21 ± 0,75	6,60 ± 0,43	5,90 ± 0,32
Ureia (mg/dL)	44,67 ± 0,93	39,70 ± 4,80	43,16 ± 3,44
Creatinina (mg/dL)	0,41 ± 0,23	0,43 ± 0,21	0,44 ± 0,18
Bilirrubina (mg/dL)	0,26 ± 0,09	0,17 ± 0,06	0,15 ± 0,09
Colesterol total (mg/dL)	83,35 ± 3,47	86,50 ± 4,57	75,98 ± 5,89
Triglicerídeos (mg/dL)	106,7 ± 5,34	110,7 ± 3,35	116,60 ± 7,83

Valores apresentados em média±DP. Dados submetidos ao teste estatístico U de Mann-Whitney. Onde foram comparados os grupos tratados com o grupo controle negativo, $P > 0,05$. CN: controle negativo. EX1: extrato aquoso da casca da *C. leptophloeos*. EX2: extrato aquoso das folhas da *C. leptophloeos*.

3.2.4 Análise histomorfométrica

Não foram identificados danos celulares ou infiltrados inflamatórios nos tecidos dos rins, fígado e baço. Não houve alteração da quantidade de hepatócitos nem da área nuclear destas células no fígado. Também não foram vistas alterações nas áreas dos glomérulos e da cápsula do corpúsculo renal. Bem como as polpas brancas e vermelhas do baço mostraram-se normais.

Figura 10: Estruturas analisadas na histomorfometria.

Lâminas coradas com hematoxilina e eosina. A: fotomicrografia do rim em aumento de 400x; cabeça de seta: cápsula glomerular; seta: delimitação do glomérulo. B: fotomicrografia do fígado em aumento de 400x; seta: hepatócitos. C: fotomicrografia do baço em aumento de 100x; cabeça de seta: polpa branca; seta: polpa vermelha.

Tabela 5: Análise histomorfométrica do fígado, rins e baço. Os valores estão expressos em média por desvio padrão.

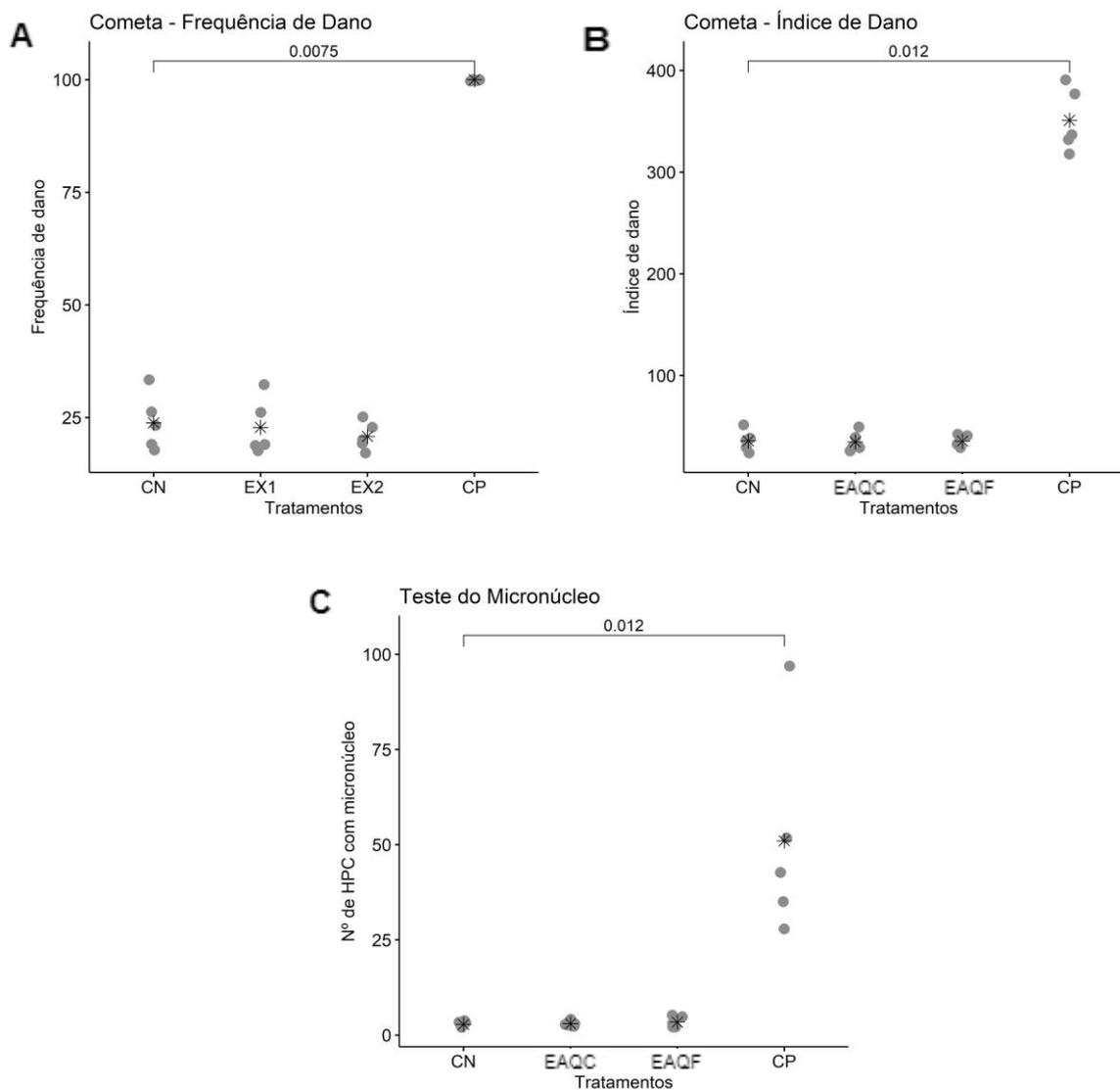
Órgãos	Parâmetros avaliados	CN	EAQC	EAQF
Fígado	Nº de hepatócitos	75,53 ± 11,21	74,98 ± 9,87	79,01 ± 10,04
	Área do Núcleo (µm ²)	68,16 ± 23,68	65,64 ± 22,13	78,23 ± 22,91
Rim	Área da cápsula (µm ²)	4207,16 ± 1290,94	4506,58 ± 1514,21	3767,32 ± 1253,59
	Área do glomérulo (µm ²)	3229,13 ± 2772,35	2941,14 ± 955,75	3194,63 ± 1137,65
Baço	Área da polpa vermelha (%)	69,21 ± 12,13	66,64 ± 14,08	72,02 ± 9,75
	Área da polpa branca (%)	27,87 ± 9,75	30,69 ± 12,13	33,25 ± 14,08

Valores apresentados em média ± DP. Dados submetidos ao teste estatístico U de Mann-Whitney. Onde foram comparados os grupos tratados com o grupo controle negativo, P > 0,05. CN: controle negativo. EAQC1: extrato aquoso da casca da *C. leptophloeos*. EAQF: extrato aquoso das folhas da *C. leptophloeos*.

3.3 Ensaios genotóxico e mutagênico

Não houve alterações na frequência de dano, no índice de dano nem na quantidade de micronúcleos de eritrócitos policromados do sangue dos animais tratados com os extratos da planta. Todos os grupos tratados apresentaram valores semelhantes ao grupo controle negativo.

Figura 11: Resultados dos testes de ensaio cometa (A, B) e micronúcleo (C).



Resultados expressos em frequência de dano, índice de dano e frequência de micronúcleos. Os grupos EX1 e EX2 foram comparados com os CN, através do teste de Wilcoxon, $P > 0,05$. CN: Controle negativo; EX1: extrato aquoso da casca; EX2: extrato aquoso da folha; CP: controle positivo, tratado com ciclofosfamida.

4 Discussão

A CL é uma importante fonte de compostos biologicamente ativos, pois, há evidências populares de sua eficácia contra doenças inflamatórias (AGRA et al., 2007; CARTAXO; DE ALMEIDA SOUZA; DE ALBUQUERQUE, 2010; DE ALBUQUERQUE et al., 2007; TRENTIN et al., 2011) e estudos experimentais apresentando atividade antiinflamatória (DANTAS-MEDEIROS et al., 2021a), antidiarréica (PESSOA et al., 2021) e antioxidante *in vivo* (CORDEIRO et al., 2021), podendo ser justificada por sua composição rica em polifenóis, mais especificamente neste estudo, o ácido gálico, a catequina e epicatequina na casca, e ácido clorogênico nas folhas. Além disso, até o presente momento mostra-se segura para consumo, visto que não há evidências de toxicidade nas populações que a consomem e não há dados experimentais relatando tais efeitos.

O ácido gálico é conhecido por possuir atividades antiinflamatórias, antioxidantes, anticâncer e antimicrobianos (FERRARIS et al., 2020); e o ácido clorogênico tem efeito redutor de colesterol total, modula o metabolismo da glicose, inibe o crescimento da população de progenitores de adipócitos e tem efeito protetor contra danos de DNA (CORTI et al., 2018; NAVEED et al., 2018; XU, et al 2012). Esses dois também foram identificados no estudo de De Souza Pereira et al. (2017), enquanto a catequina e epicatequina foram identificados pela primeira vez nesta espécie. A catequina é considerada um antilipemiante, antidiabético e ajuda a prevenir doenças cardiovasculares (WANG, 2011, YANG et al., 2001, ZAVERI, 2006, HASHIMOTO et al., 2003). E a epicatequina colabora na diminuição da agregação plaquetária, sendo então anticoagulante e pró-fibrinolítica (ABOU-AGAG et al., 2001; SINEGRE et al., 2019). A isoorientina, orientina, vitexina, isoquercetina, quercitrina, luteolina e quercetina foram identificados nas folhas (DANTAS-MEDEIROS et al., 2021a; PESSOA et al., 2021) e ácido quínico na casca (DANTAS-MEDEIROS et al., 2021b). Esta variação química é explicada pelas diferentes composições dos tecidos vegetais, período do ano e localização da espécime utilizada, bem como a forma de extração e preparação dos extratos brutos (JONES; KINGHORN, 2012).

Neste estudo a CL não mostrou-se tóxica para células saudáveis e cancerígenas pelo método MTT, que mede a viabilidade por meio da respiração celular a nível mitocondrial (DA SILVA et al., 2019). A porcentagem da viabilidade celular aumentou quando submetida a três concentrações mais baixas do EAQF e nas duas menores concentrações do EAQC (Figura 5A), é comum que isso ocorra com extratos de plantas, pois, eles possuem uma grande diversidade de componentes e

nem sempre é possível identificá-los, não sabendo exatamente a influência deles quando adicionados às culturas de células (ROCHA et al., 2019, KARAKAS et al., 2017), sendo então, necessários estudos mais detalhados quanto a composição e mecanismo de ação.

Nos experimentos *in vivo*, foram verificadas a nefrotoxicidade e a hepatotoxicidade por meio de testes sorológicos bioquímicos e histomorfometria, que não apresentaram alterações. Isso é importante, pois mostra que o fígado e rins não sofreram danos. A principal função do fígado é a metabolização de compostos que entram no organismo e são absorvidos pelo intestino, através de transformações químicas que acontecem principalmente pelos hepatócitos (LI, RALPHS, TOSH, 2010; BISSIG et al., 2018). Quando há alterações neste órgão, os parâmetros dos níveis séricos de albumina, alanina aminotransferase, aspartato aminotransferase, fosfatase alcalina, proteínas totais, bilirrubina, colesterol total e triglicerídeos, são alterados, bem como a histologia do órgão em danos mais graves (INGAWALE, MANDLIKET, NAIK, 2014; MOHI-UD-DIN et al., 2019).

Em contrapartida, os rins são responsáveis pela filtração do plasma sanguíneo e excreção de substâncias tóxicas ou em excesso no corpo (SHEN, SCIALIS, LEHMAN-MCKEEMAN, 2019). Eles são formados principalmente pelos nefros, unidade morfofuncional, que produzem a urina. Neles foram analisados o glomérulo e o corpúsculo renal, estruturas responsáveis pela filtração (DERAKHSHANFAR et al., 2013), e seus parâmetros bioquímicos foram avaliados pelos níveis de uréia e creatinina no sangue, e todos mostraram-se normais.

O baço, maior órgão linfóide, funciona como um filtro fagocitário e imunológico do sangue (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013), também foi analisado morfológicamente e não apresentou alteração. Nele foram verificadas as áreas de polpa branca e a polpa vermelha, a primeira é formada principalmente por nódulos linfáticos, enquanto a segunda é formada por glóbulos brancos e vermelhos (CESTA et al., 2006; MANDIL et al., 2020).

O ensaio cometa e teste de micronúcleo não evidenciaram alterações, mostrando que os extratos não ocasionaram danos ao DNA e nem promoveram a formação de micronúcleos em eritrócitos. De acordo com Chandrasekaran et al. (2009), estudos genotóxicos e mutagênicos são importantes para definir a segurança toxicológica de determinados compostos, extratos de plantas, que possuem uma grande combinação de compostos (JONES; KINGHORN, 2012).

5 Considerações finais

A *commiphora leptophloeos* é uma planta nativa da caatinga com grande potencial biológico. Os extratos aquosos da casca e folhas são ricos em flavonoides e compostos fenólicos, e possuem atividade antioxidante *in vitro*. Além disso, nas concentrações testadas mostraram-se seguros em culturas de células (saudáveis e cancerígenas) e em camundongos, não ocasionando danos a nível fisiológico, comportamental, bioquímico, morfológico e genético.

Conflitos de interesse

Não há conflitos de interesse.

Financiamento

Este trabalho teve apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

4 CONCLUSÕES

Os extratos aquosos da casca e folhas da *Commiphora leptophloeos* são ricos em polifenóis, possuem atividade antioxidante *in vitro* e apresentam baixa toxicidade em camundongos tratados com a dose de 2000mg/kg, levando em consideração os protocolos experimentais de toxicologia da OECD (OECD, 2002).

REFERÊNCIAS

- ABOU-AGAG, L. H. et al. Polyphenolics Increase t-PA and u-PA Gene Transcription in Cultured Human Endothelial Cells. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, New York, v. 25, n. 2, p. 155–162, fev. 2001.
- AGRA, M. F. et al. Medicinal and poisonous spanersity of the flora of “Cariri Paraibano”, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 111, n. 2, p. 383–395, maio 2007.
- ALBUQUERQUE, U. P. DE; OLIVEIRA, R. F. DE. Is the use-impact on native caatinga species in Brazil reduced by the high species richness of medicinal plants? **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 113, n. 1, p. 156–170, ago. 2007.
- ALMEIDA, M. L. B. et al. Bioactive compounds and antioxidant potential fruit of *Ximenia americana* L. **Food Chemistry**, Barking, v. 192, p. 1078–1082, fev. 2016.
- ALVAREZ, I. A.; DE OLIVEIRA, A. R. Manejo da Caatinga é essencial ao desenvolvimento do Semiárido. **Embrapa Semiárido-Artigo de divulgação na mídia (INFOTECA-E)**, 2013. Disponível em <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/948634>. Acesso em 10 fev 2022.
- ANDRES-RODRIGUEZ, N. et al. Actualidad de las Plantas Medicinales en Terapéutica. **Acta Farmacêutica Portuguesa**, Porto, v. 4, n. 1, p. 42–52, 2015.
- ARAÚJO FILHO, J. **Manejo pastoril sustentável da caatinga**. IICA, Brasília (Brasil). Projeto Dom Helder Camara, Recife (Brasil). Projeto SEMEAR, Brasília (Brasil). Associação Brasileira de Agroecologia, Rio Grande do Sul (Brasil), 2013.
- ASADI, S. et al. In vitro antioxidant activities and an investigation of neuroprotection by six *Salvia* species from Iran: A comparative study. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 48, n. 5, p. 1341–1349, maio 2010.
- BALTAR, S. L. S. M. DE A. et al. Epidemiologia das intoxicações por plantas notificadas pelo Centro de Assistência Toxicológica de Pernambuco (CEATOX-PE) de 1992 a 2009. **Revista Fitos**, Rio de Janeiro, v. 10, n. 4, 2017.
- RIBEIRO, L. B.; FREIRE, E. M. X. Trophic ecology and foraging behavior of *Tropidurus hispidus* and *Tropidurus semitaeniatus* (Squamata, Tropiduridae) in a caatinga area of northeastern Brazil. **Iheringia. Série Zoologia**, Porto Alegre, v. 101, n. 3, p. 225–232, set. 2011.
- BEUCHLE, R. et al. Land cover changes in the Brazilian Cerrado and Caatinga biomes from 1990 to 2010 based on a systematic remote sensing sampling approach. **Applied Geography**, (s.l.), v. 58, p. 116–127, mar. 2015.
- BEZERRA, Lireida Maria Albuquerque. **Análise dos impactos sócio-ambientais decorrentes da mineração na Chapada do Araripe – Nova Olinda/Ceará**. 2013. 139 f. Dissertação (Mestrado em geografia) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-CE, 2013.

- BISSIG, K.-D. et al. P450-Humanized and Human Liver Chimeric Mouse Models for Studying Xenobiotic Metabolism and Toxicity. **Drug Metabolism and Disposition**, Bethesda, v. 46, n. 11, p. 1734–1744, 9 ago. 2018.
- BISHT, D.; OWAIS, M.; VENKATESAN, K. Potential of Plant-Derived Products in the Treatment of Mycobacterial Infections. In: **Modern Phytomedicine**. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, [s.d.]. p. 293–311.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS – PNPIC**. Brasília: Ministério da Saúde, 2006.
- BRASIL. Agência nacional de vigilância sanitária. **Resolução RDC no 10, de 9 de março de 2010**. 2010. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2010/res0010_09_03_2010.html. Acesso em: 10 fev. 2022.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. 2009. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/sus/pdf/marco/ms_relacao_plantas_medicinais_sus_0603.pdf. Acesso em: 09 fev 2022.
- BUNCHORNTAVAKUL, Chalermrat; REDDY, K. Rajender. Acetaminophen-related hepatotoxicity. **Clinics in liver disease**, Philadelphia, v. 17, n. 4, p. 587-viii, 2013.
- CARTAXO, S. L.; DE ALMEIDA SOUZA, M. M.; DE ALBUQUERQUE, U. P. Medicinal plants with bioprospecting potential used in semi-arid northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 131, n. 2, p. 326–342, set. 2010.
- CARVALHO, P. E. R. **Espécies arbóreas brasileiras**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Colombo: Embrapa Florestas, v. 3, 2008.
- CESTA, M. F. Normal Structure, Function, and Histology of the Spleen. **Toxicologic Pathology**, Thousand Oaks, v. 34, n. 5, p. 455–465, ago. 2006.
- CHANDRASEKARAN, C. V. et al. Evaluation of the genotoxic potential and acute oral toxicity of standardized extract of *Andrographis paniculata* (KalmCold™). **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 47, n. 8, p. 1892–1902, ago. 2009.
- CHOMEL, M. et al. Plant secondary metabolites: a key driver of litter decomposition and soil nutrient cycling. **Journal of Ecology**, London, v. 104, n. 6, p. 1527–1541, 15 ago. 2016.
- SIES, H. Strategies of antioxidant defense. In: **EJB Reviews 1993**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1994. p. 101–107.
- COLLINS, Andrew R. et al. The comet assay: topical issues. **Mutagenesis**, Oxford, v. 23, n. 3, p. 143-151, 2008.
- DA COSTA CORDEIRO, B. M. P. et al. Hexane extract from *Spondias tuberosa* (Anacardiaceae) leaves has antioxidant activity and is an anti-*Candida* agent by causing mitochondrial and lysosomal damages. **BMC Complementary and**

Alternative Medicine, London, v. 18, n. 1, 19 out. 2018.

CORDEIRO, M. L. DA S. et al. Antioxidant Activities of *Commiphora leptophloeos* (Mart.) J. B. Gillett) (Burseraceae) Leaf Extracts Using In Vitro and In Vivo Assays. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, New York, v. 2021, p. 1–11, 24 abr. 2021.

CORTI, Angelo; MARCUCCI, Fabrizio; BACHETTI, Tiziana. Circulating chromogranin A and its fragments as diagnostic and prognostic disease markers. **Pflügers Archiv-European Journal of Physiology**, (s.l.), v. 470, n. 1, p. 199-210, 2018.

CRISTÓVÃO, C. et al. Avaliação do equilíbrio entre oxidantes e antioxidantes na patogénese da doença pulmonar obstrutiva crónica. **Revista Portuguesa de Pneumologia**, Barcelona, v. 19, n. 2, p. 70–75, mar. 2013.

DA SILVA, M. M. et al. Effect of acute exposure in swiss mice (*Mus musculus*) to a fibrinolytic protease produced by *Mucor subtilissimus* UCP 1262: An histomorphometric, genotoxic and cytological approach. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, New York, v. 103, p. 282–291, abr. 2019.

DA SILVA, R. C. S. et al. (E)-Caryophyllene and α -Humulene: *Aedes aegypti* Oviposition Deterrents Elucidated by Gas Chromatography-Electrophysiological Assay of *Commiphora leptophloeos* Leaf Oil. **PLOS ONE**, San Francisco, v. 10, n. 12, p. e0144586, 9 dez. 2015.

DANTAS-MEDEIROS, R. et al. Mass spectrometry characterization of *Commiphora leptophloeos* leaf extract and preclinical evaluation of toxicity and anti-inflammatory potential effect. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 264, p. 113229, jan. 2021a.

DANTAS-MEDEIROS, R. et al. Antifungal and Antibiofilm Activities of B-Type Oligomeric Procyanidins From *Commiphora leptophloeos* Used Alone or in Combination With Fluconazole Against *Candida* spp. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 12, 22 fev. 2021b.

DE ALBUQUERQUE, U. P. et al. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 114, n. 3, p. 325–354, dez. 2007.

DE ARAUJO, V. K. R. et al. Influence of leaf morphometric variations on the growth of seedlings and juveniles of woody species in a semiarid environment. **Brazilian Journal of Botany**, São Paulo, v. 40, n. 4, p. 1019–1028, 26 jul. 2017.

DE MORAES, B. L. C.; DA SILVA SOUTO, A.; SCHIEL, N. Adaptability in stone tool use by wild capuchin monkeys (*Sapajus libidinosus*). **American Journal of Primatology**, New York, v. 76, n. 10, p. 967–977, 18 abr. 2014.

SOUSA COELHO, I. D. D. DE et al. Protective effect of exogenous melatonin in rats and their offspring on the genotoxic response induced by the chronic consumption of alcohol during pregnancy. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, Amsterdam, v. 832–833, p. 52–60, ago. 2018.

DERAKHSHANFAR, A.; ROSHANZAMIR, M.; BIDADKOSH, A. Dose-related protecting effects of vitamin C in gentamicin-induced rat nephrotoxicity: a

- histopathologic and biochemical study. **Comparative Clinical Pathology**, Switzerland, v. 22, n. 3, p. 441–447, 10 fev. 2012.
- DE SOUZA PEREIRA, J. J. et al. Commiphora leptophloeos Phytochemical and Antimicrobial Characterization. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 8, 24 jan. 2017.
- DE-LA-CRUZ CHACÓN, I.; GONZÁLEZ-ESQUINCA, A. R.; RILEY-SALDAÑA, C. A. Biosíntesis de alcaloides bencilisoquinolínicos. **Universitas Scientiarum**,(s.l), v. 17, n. 2, p. 189, 1 jun. 2012.
- DING, C. et al. Distribution and quantitative analysis of phenolic compounds in fractions of Japonica and Indica rice. **Food Chemistry**, Barking, v. 274, p. 384–391, fev. 2019.
- DRASAR, P. B.; KHRIPACH, V. A. Growing Importance of Natural Products Research. **Molecules**, Basel, v. 25, n. 1, p. 6, 18 dez. 2019.
- DUMITRIU, D. et al. Grape pomace extract improves the in vitro and in vivo antioxidant properties of wines from sun light dried Pedro Ximénez grapes. **Journal of Functional Foods**, London, v. 17, p. 380–387, ago. 2015.
- FERNANDES, Moabe Ferreira; QUEIROZ, Luciano Paganucci de. Vegetação e flora da Caatinga. **Cienc. Cult.**, São Paulo, v. 70, n. 4, p. 51-56, Oct. 2018 .
- FERRARIS, S. et al. Grafting of gallic acid to metallic surfaces. **Applied Surface Science**, (s.l.), v. 511, p. 145615, maio 2020.
- FEITOSA FERRAZ, J. S.; CARACIOLO FERREIRA, R. L.; FERREIRA DOS SANTOS, M. V. Usos de especies leñosas de la caatinga del municipio de Floresta en Pernambuco, Brasil: conocimiento de los indios de la aldea Travessão do Ouro. **Bosque (Valspania)**, Valdivia, v. 33, n. 2, p. 15–16, ago. 2012.
- GEORGE, D. R. et al. Medicinal plants—the next generation. **The Lancet**, London, v. 387, n. 10015, p. 220–221, jan. 2016.
- JIN, G.-L. et al. Medicinal plants of the genus Gelsemium (Gelsemiaceae, Gentianales) —A review of their phytochemistry, pharmacology, toxicology and traditional use. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 152, n. 1, p. 33–52, fev. 2014.
- GOMES, C. C. Potencial utilitário da vegetação lenhosa em área de Caatinga no estado de Pernambuco, nordeste do Brasil. **Ciência Florestal**, v. 29, n. 1, p. 307–321, 4 abr. 2019.
- GOMES DE MELO, J. et al. Antiproliferative Activity, Antioxidant Capacity and Tannin Content in Plants of Semi-Arid Northeastern Brazil. **Molecules**, Basel, v. 15, n. 12, p. 8534–8542, 24 nov. 2010.
- GRIS, E. F. et al. Stilbenes and Tyrosol as Target Compounds in the Assessment of Antioxidant and Hypolipidemic Activity of Vitis vinifera Red Wines from Southern Brazil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 59, n. 14, p. 7954–7961, 30 jun. 2011.

HASHIMOTO, F. et al. Evaluation of the Anti-oxidative Effect (in vitro) of Tea Polyphenols. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, Tokyo, v. 67, n. 2, p. 396–401, jan. 2003.

HAYASHI, M. et al. The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides. **Mutation Research Letters**, Amsterdam, v. 245, n. 4, p. 245–249, dez. 1990.

HUANG, X. et al. Natural products for treating colorectal cancer: A mechanistic review. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, New York, v. 117, p. 109142, set. 2019.

INGAWALE, D. K.; MANDLIK, S. K.; NAIK, S. R. Models of hepatotoxicity and the underlying cellular, biochemical and immunological mechanism(s): A critical discussion. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, Amsterdam, v. 37, n. 1, p. 118–133, jan. 2014.

ISAH, T. Stress and defense responses in plant secondary metabolites production. **Biological Research**, Santiago, v. 52, n. 1, 29 jul. 2019.

ESCALONA CRUZ, Luis Jesús et al. Uso tradicional de plantas medicinales por el adulto mayor en la comunidad serrana de Corralillo Arriba. Guisa, Granma. **Rev Cubana Plant Med**, Habana, v. 20, n. 4, dic. 2015.

JÚNIOR, W. S. F.; LADIO, A. H.; ALBUQUERQUE, U. P. DE. Resilience and adaptation in the use of medicinal plants with suspected anti-inflammatory activity in the Brazilian Northeast. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 138, n. 1, p. 238–252, out. 2011.

JUNQUEIRA, LC; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.

KARAKAŞ, D.; ARI, F.; ULUKAYA, E. The MTT viability assay yields strikingly false-positive viabilities although the cells are killed by some plant extracts. **Turkish Journal of Biology**, Ankara, Vol. 41 Issue 6, p919-925. 7p, 2017.

LEAL, Inara R.; TABARELLI, Marcelo; SILVA, JMC da. Ecologia e conservação da caatinga: uma introdução ao desafio. Recife: Ed. Universitária da UFPE, 2003.

LI, W.-C.; RALPHS, K. L.; TOSH, D. Isolation and Culture of Adult Mouse Hepatocytes. In: **Methods in Molecular Biology**. Totowa, NJ: Humana Press, 2010. p. 185–196.

LUCENA, Reinaldo Farias Paiva de et al. Uso de recursos vegetais da Caatinga em uma comunidade rural no Curimataú paraibano (Nordeste do Brasil). **Polibotânica**, México, n. 34, p. 237-258, 2012.

MAIA, J. M. et al. Motivações socioeconômicas para a conservação e exploração sustentável do bioma Caatinga. **Desenvolvimento e Meio Ambiente**, Curitiba, v. 41, 30 ago. 2017.

MANDIL, R. et al. In vitro and in vivo effects of flubendiamide and copper on cytogenotoxicity, oxidative stress and spleen histology of rats and its modulation by resveratrol, catechin, curcumin and α -tocopherol. **BMC Pharmacology and Toxicology**, London, v. 21, n. 1, 23 abr. 2020.

MANLEY, D. **Manley's Technology of Biscuits, Crackers and Cookies**. [s.l.] Elsevier, 2011.

MARQUES, A. M. et al. Echinodorus grandiflorus: Ethnobotanical, phytochemical and pharmacological overview of a medicinal plant used in Brazil. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 109, p. 1032–1047, nov. 2017.

MARTINS, C. F. et al. Espécies arbóreas utilizadas para nidificação por abelhas sem ferrão na caatinga (Seridó, PB; João Câmara, RN). **Biota Neotropica**, Campinas, v. 4, n. 2, p. 1–8, 2004.

OLIVEIRA BRITO PEREIRA BEZERRA MARTINS, A. et al. Anti-Inflammatory and Physicochemical Characterization of the Croton rhamnifolioides Essential Oil Inclusion Complex in β -Cyclodextrin. **Biology**, Basel, v. 9, n. 6, p. 114, 30 maio 2020.

MENDES, V. A. et al. AVALIAÇÃO DO USO DE PRODUTOS NATURAIS NA PRÁTICA DO PROFISSIONAL DE SAÚDE. **Saúde (Santa Maria)**, Santa Maria, v. 44, n. 1, 18 abr. 2018.

NAVEED, M. et al. Chlorogenic acid (CGA): A pharmacological review and call for further research. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, New York, v. 97, p. 67–74, jan. 2018.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products As Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 75, n. 3, p. 311–335, 8 fev. 2012.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 79, n. 3, p. 629–661, 2016.

OECD, **Test No. 423: Acute Oral toxicity - Acute Toxic Class Method**, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, 2002. Disponível em: https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-423-acute-oral-toxicity-acute-toxic-class-method_9789264071001-en. Acesso em: 10 de fev de 2022.

OECD, **Test No. 407: Repeated Dose 28-day Oral Toxicity Study in Rodents**, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, 2008. Disponível em: https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-407-repeated-dose-28-day-oral-toxicity-study-in-rodents_9789264070684-en. Acesso em: 10 de fev de 2022.

OECD, **Test No. 452: Chronic Toxicity Studies**, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, 2018. Disponível em: https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-452-chronic-toxicity-studies_9789264071209-en. Acesso em: 10 de fev de 2022.

OECD, **Test No. 409: Repeated Dose 90-Day Oral Toxicity Study in Non-Rodents**, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, 1998. Disponível em: <https://www.oecd->

ilibrary.org/environment/test-no-409-repeated-dose-90-day-oral-toxicity-study-in-non-rodents_9789264070721-en. Acesso em 10 de fev de 2022.

OECD, **Test No. 487: In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test**, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, 2016b. Disponível em: <https://www.oecd.org/chemicalsafety/test-no-487-in-vitro-mammalian-cell-micronucleus-test-9789264264861-en.htm>. Acesso em 10 de fev 2022.

OECD, **Test No. 489: In Vivo Mammalian Alkaline Comet Assay**, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, 2016a. Disponível em: https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-489-in-vivo-mammalian-alkaline-comet-assay_9789264264885-en. Acesso em 10 de fev de 2022.

DE OLIVEIRA-JÚNIOR, R. G. et al. Antibacterial activity of terpenoids isolated from *Cnidocolus quercifolius* Pohl (Euphorbiaceae), a Brazilian medicinal plant from Caatinga biome. **European Journal of Integrative Medicine**, Amsterdam, v. 24, p. 30–34, dez. 2018.

PAREYN, FGC; ARAÚJO, E. de L.; DRUMOND, M. A. *Commiphora leptophloeos*: Umburana-de-cambão. In: CORADIN, L.; CAMILLO, J.; PAREYN, F. G. C. (Ed.). *Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial: plantas para o futuro: região Nordeste*. Brasília, DF: MMA, 2018.

DE SOUZA PEREIRA, J. J. D. S. et al. *Commiphora leptophloeos* Phytochemical and Antimicrobial Characterization. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 8, n. JAN, p. 1–10, 2017.

PESSOA, R. F. et al. Investigation of ethnomedicinal use of *Commiphora leptophloeos* (Mart.) J. B. Gillett (Burseraceae) in treatment of diarrhea. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 268, p. 113564, mar. 2021.

PILLA, M. A. C.; AMOROZO, M. C. DE M.; FURLAN, A. Obtenção e uso das plantas medicinais no distrito de Martim Francisco, Município de Mogi-Mirim, SP, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, Alta Floresta, v. 20, n. 4, p. 789–802, dez. 2006.

PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric Quantitation of Antioxidant Capacity through the Formation of a Phosphomolybdenum Complex: Specific Application to the Determination of Vitamin E. **Analytical Biochemistry**, v. 269, n. 2, p. 337–341, maio 1999.

POSADZKI, P.; WATSON, L.; ERNST, E. Herb-drug interactions: an overview of systematic reviews. **British Journal of Clinical Pharmacology**, London, v. 75, n. 3, p. 603–618, 5 fev. 2013.

PYE, C. R. et al. Retrospective analysis of natural products provides insights for future discovery trends. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 114, n. 22, p. 5601–5606, 1 maio 2017.

RIBEIRO, V. P. et al. Brazilian medicinal plants with corroborated anti-inflammatory activities: a review. **Pharmaceutical Biology**, Lisse, v. 56, n. 1, p. 253–268, 1 jan. 2018.

- ROCHA, T. A. et al. Evaluation of cytotoxic potential, oral toxicity, genotoxicity, and mutagenicity of organic extracts of *Pityrocarpa moniliformis*. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, Washington, v. 82, n. 3, p. 216–231, 1 fev. 2019.
- ROCHA, G. M.; ROCHA, ME do N. Uso popular de plantas medicinais. **Saúde e Ambiente em Revista**, Duque de Caxias, v. 1, n. 2, p. 76-85, 2006.
- RODRIGUES, J. P. et al. Characterization and mapping of secondary metabolites of *Streptomyces* sp. from caatinga by desorption electrospray ionization mass spectrometry (DESI–MS). **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 410, n. 27, p. 7135–7144, 8 set. 2018.
- SÁ, P. G. S. et al. Fenóis totais, flavonoides totais e atividade antioxidante de *Selaginella convoluta* (Arn.) Spring (Selaginellaceae). **Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences**, Araraquara, v. 33, n. 4, 2012.
- SANTOS, A. M. A. DOS et al. Reflexões sobre os efeitos das mudanças climáticas na biospannersidade da caatinga. **Diversitas Journal**, Santana do Ipanema, v. 1, n. 1, p. 113, 1 jan. 2016.
- SANTOS, K. A. et al. Chemical composition, antioxidant activity and thermal analysis of oil extracted from favela (*Cnidocolus quercifolius*) seeds. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 97, p. 368–373, mar. 2017.
- SEEFF, L. B. Herbal Hepatotoxicity. **Clinics in Liver Disease**, Philadelphia, v. 11, n. 3, p. 577–596, ago. 2007.
- SHEN, H.; SCIALIS, R. J.; LEHMAN-MCKEEMAN, L. Xenobiotic Transporters in the Kidney: Function and Role in Toxicity. **Seminars in Nephrology**, New York, v. 39, n. 2, p. 159–175, mar. 2019.
- SHITAN, N. Secondary metabolites in plants: transport and self-tolerance mechanisms. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, Tokyo, v. 80, n. 7, p. 1283–1293, 2 jul. 2016.
- SILVA, R. C. S. et al. Aspectos fitossociológicos e de crescimento de *Commiphora leptophloeos* no semiárido brasileiro. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, v. 37, n. 89, p. 11, 31 mar. 2017.
- SILVA, C. G. et al. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais em área de Caatinga na comunidade do Sítio Nazaré, município de Milagres, Ceará, Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Maringá, v. 17, n. 1, p. 133–142, mar. 2015.
- SILVA, A. C.; SOUZA, A. F. Aridity drives plant biogeographical sub regions in the Caatinga, the largest tropical dry forest and woodland block in South America. **PLOS ONE**, San Francisco, v. 13, n. 4, p. e0196130, 27 abr. 2018.
- SILVA, J. I. A. O. Desenvolvimento e meio ambiente no semiárido: contradições do modelo de conservação das Reservas Particulares do Patrimônio Natural (RPPNs) na Caatinga. **Sociedade e Estado**, Brasília, v. 32, n. 2, p. 313–344, ago. 2017.
- SINEGRE, T. et al. Epicatechin influences primary hemostasis, coagulation and

fibrinolysis. **Food & Function**, Cambridge, v. 10, n. 11, p. 7291–7298, 2019.

SINGLETON, Vernon L.; ROSSI, Joseph A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 16, n. 3, p. 144-158, 1965.

SOLDATI, G. T. et al. Does Environmental Instability Favor the Production and Horizontal Transmission of Knowledge regarding Medicinal Plants? A Study in Southeast Brazil. **PLOS ONE**, San Francisco, v. 10, n. 5, p. e0126389, 20 maio 2015.

SOUZA, E. R. L. DE et al. Propriedades farmacológicas do Sesquiterpeno α - Bisabolol: uma breve revisão. **ARCHIVES OF HEALTH INVESTIGATION**, [S. l.], v. 10, n. 1, p. 18–23, 11 abr. 2020.

SPERLE DA SILVA, D. V.; MADUREIRA CRUZ, C. B. Tipologias de Caatinga: Uma Revisão em Apoio a Mapeamentos Através de Sensoriamento Remoto Orbital e GEOBIA. **Geography Department University of Sao Paulo**, São Paulo, v. 35, p. 113–120, 24 jul. 2018.

TEIXEIRA-SANTOS, Isabel et al. The evidence of medicinal plants in human sediments from Furna do Estrago prehistoric site, Pernambuco State, Brazil. **Quaternary International**, Budapeste, v. 377, p. 112-117, 2015.

TEIXIDOR-TONEU, I.; JORDAN, F. M.; HAWKINS, J. A. Comparative phylogenetic methods and the cultural evolution of medicinal plant use. **Nature Plants**, London, v. 4, n. 10, p. 754–761, 10 set. 2018.

TICE, R. R. et al. Single cell gel/comet assay: Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, New York, v. 35, n. 3, p. 206–221, 6 jun. 2000.

TUROLLA, M. S. DOS R.; NASCIMENTO, E. DE S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 42, n. 2, p. 289–306, jun. 2006.

TRENTIN, D. DA S. et al. Potential of medicinal plants from the Brazilian semi-arid region (Caatinga) against *Staphylococcus epidermidis* planktonic and biofilm lifestyles. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 137, n. 1, p. 327–335, set. 2011.

TRENTIN, D. S. et al. Tannins Possessing Bacteriostatic Effect Impair *Pseudomonas aeruginosa* Adhesion and Biofilm Formation. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 8, n. 6, p. e66257, 11 jun. 2013.

VALADARES, M. C. AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE AGUDA: ESTRATÉGIAS APÓS A “ERA DO TESTE DL50”. **Revista Eletrônica de Farmácia**, Goiânia, v. 3, n. 2, 23 out. 2007.

VASCONCELOS, T.B. et al. Radicais Livres e Antioxidantes: Proteção ou Perigo?. **Journal of Health Sciences**, Londrina, v. 16, n. 3, p. 213-219, 2014.

VIEIRA, M. J. **Análise do setor de plantas medicinais e fitoterápicos - como alternativa de desenvolvimento regional para Santa Catarina**. 2008. 114 f.

Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento Regional pela Universidade do Contestado) - Universidade do Contestado, Canoinhas, 2008.

WANG, F. Catechin-enriched green tea extract as a safe and effective agent for antimicrobial and anti-inflammatory treatment. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, Lagos, v. 5, n. 12, p. 1452–1461, 29 set. 2011.

WINK, M. Plant Secondary Metabolism: Diversity, Function and its Evolution. **Natural Product Communications**, Westerville, v. 3, n. 8, p. 1934578X0800300, ago. 2008.

WOISKY, R. G.; SALATINO, A. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. **Journal of Apicultural Research**, Gerrards Cross, v. 37, n. 2, p. 99–105, jan. 1998.

WOLPE SIMAS, L. A.; GRANZOTI, R. O.; PORSCH, L. Estresse oxidativo e o seu impacto no envelhecimento: uma revisão bibliográfica. **Brazilian Journal of Natural Sciences**, [S. l.], v. 2, n. 2, 21 maio 2019.

WURTZEL, E. T.; KUTCHAN, T. M. Plant metabolism, the sparser chemistry set of the future. **Science**, New York, v. 353, n. 6305, p. 1232–1236, 16 set. 2016.

XU, J.-G.; HU, Q.-P.; LIU, Y. Antioxidant and DNA-Protective Activities of Chlorogenic Acid Isomers. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 60, n. 46, p. 11625–11630, 13 nov. 2012.

YANG, B. et al. Relationship of Electrochemical Oxidation of Catechins on Their Antioxidant Activity in Microsomal Lipid Peroxidation. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 49, n. 6, p. 747–751, 2001.

YANG, L. et al. Response of Plant Secondary Metabolites to Environmental Factors. **Molecules**, Basel, v. 23, n. 4, p. 762, 27 mar. 2018.

ZAPPI, D. C.; FILARDI, Fabiana L. Ranzato; LEITMAN, Paula; et al. Growing knowledge: an overview of Seed Plant diversity in Brazil. **Rodriguésia**, Rio de Janeiro, v. 66, n. 4, p. 1085–1113, 2015.

ZAVERI, N. T. Green tea and its polyphenolic catechins: Medicinal uses in cancer and noncancer applications. **Life Sciences**, Oxford, v. 78, n. 18, p. 2073–2080, mar. 2006.

ZAYNAB, M. et al. Role of secondary metabolites in plant defense against pathogens. **Microbial Pathogenesis**, London, v. 124, p. 198–202, nov. 2018.

JONES, W. P.; KINGHORN, A. D. Extraction of Plant Secondary Metabolites. In: **Natural Products Isolation**. Totowa, NJ: Humana Press, 2006. p. 323–351.

MOHI-UD-DIN, R. et al. Possible Pathways of Hepatotoxicity Caused by Chemical Agents. **Current Drug Metabolism**, Hilversum, v. 20, n. 11, p. 867–879, 30 dez. 2019.