



Universidade Federal de Pernambuco  
Centro de Biociências

SUYANE DE DEUS E MELO

**AVALIAÇÃO CITOGENOTÓXICA DE EXTRATOS DAS  
ESPÉCIES *Mimosa candollei* R. Grether E *Cajanus cajan*  
(L.) Huth COM POTENCIAL PARA NOVOS AGENTES  
TERAPÊUTICOS**

Recife  
2022

SUYANE DE DEUS E MELO

**AVALIAÇÃO CITOGENOTÓXICA DE EXTRATOS DAS  
ESPÉCIES *Mimosa candollei* R. Grether E *Cajanus cajan*  
(L.) Huth COM POTENCIAL PARA NOVOS AGENTES  
TERAPÊUTICOS**

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado ao Curso de Graduação em  
Biomedicina da Universidade Federal de  
Pernambuco, como pré-requisito à  
obtenção do título de Bacharel em  
Biomedicina.

Orientador (a): Dra. Lívia Maria Batista  
Vilela

Coorientador (a): Profa Dra Ana Christina  
Brasileiro Vidal

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

Melo, Suyane de Deus.

Avaliação citogenotóxica de extratos das espécies *Mimosa candollei* R. Grether e *Cajanus cajan* (L.) Huth com potencial para novos agentes terapêuticos / Suyane de Deus Melo. - Recife, 2022.

38 : il., tab.

Orientador(a): Lívia Maria Batista Vilela

Coorientador(a): Ana Christina Brasileiro Vidal

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Biomedicina, 2022.

1. Mutagênese. 2. Fabaceae. 3. Viabilidade Celular. I. Vilela, Lívia Maria Batista. (Orientação). II. Vidal, Ana Christina Brasileiro. (Coorientação). III. Título.

570 CDD (22.ed.)

SUYANE DE DEUS E MELO

**AVALIAÇÃO CITOGENOTÓXICA DE EXTRATOS DAS  
ESPÉCIES *Mimosa candollei* R. Grether E *Cajanus cajan*  
(L.) Huth COM POTENCIAL PARA NOVOS AGENTES  
TERAPÊUTICOS**

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado ao Curso de Graduação  
em Biomedicina da Universidade  
Federal de Pernambuco, como pré-  
requisito à obtenção do título de  
Bacharel em Biomedicina.

Aprovada em: 29/06/2022

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientador: Dra. Lívia Maria Batista Vilela  
Universidade Federal de Pernambuco / Departamento de Genética

---

Profa Dra Kyria Cilene de Andrade Bortoleti  
Universidade Federal do Vale do São Francisco / Colegiado de Ciências Biológicas

---

Me. José Rafael da Silva Araujo  
Universidade Federal de Pernambuco / Departamento de Genética

Dedico este trabalho a Amélia, minha avó, matriarca da família. E, em memória, a Silvany, orientadora, professora e amiga.

## AGRADECIMENTOS

À minha Orientadora Dr.<sup>a</sup> Livia Maria Batista Vilela, agradeço pelos ensinamentos desses últimos anos. A minha coorientadora Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ana Christina Vidal Brasileiro e a Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ana Maria Benko pela confiança e oportunidade.

Ao Departamento de Genética, em especial aos Laboratório de Genética e Biotecnologia Vegetal (LGBV) e Laboratório de Genética e Citogenética Animal (LGCA) pelo espaço e equipamentos para realização dos experimentos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de Iniciação Científica durante a realização do trabalho. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pelo financiamento do projeto, o que me permitiu a realização deste trabalho.

Gostaria de agradecer também à Palloma Lima, Livia do Vale e Camila Marinho que auxiliaram no desenvolvimento desse trabalho. Da bancada a teoria. Vocês são incríveis.

À minha Família, pelo companheirismo e apoio. Do nosso jeitinho, sempre me incentivando e não deixando o desânimo me tomar conta. Dando suporte no dia a dia cansativo e puxado. Amo muito vocês.

Aos amigos, Joelson, Ayug, Wilson, Vanessa, Camila Marinho, agradeço pela empatia, torcida e incentivo nessa estapa tão importante na minha vida. À Rodrigo Assis, por ser minha inspiração acadêmica. À Larissa Azevedo, Alice, Maria Luiza, Silvia, agradeço pelo acolhimento infinito em forma de ajuda, abraço e piadas. Macelle, Bruno, Sara, Karolayne, sou muito feliz de ter conhecido e vivenciado anos da faculdade com vocês. Ao meu namorado, que sempre esteve do meu lado.

Meu agradecimento especial e saudade a Silvany Araujo, que foi a responsável direta pelo meu crescimento profissional, que me introduziu na área científica e da mutagenese, que sempre esteve comigo. Obrigada por tantos ensinamentos. Obrigada por me estimular a viver. Saudades de cuidar das nossas filhas (células) juntas, dos gritos e das gargalhadas.

MELO, Suyane de Deus. **Avaliação citogenotóxica de extratos das espécies *Mimosa candollei* R. Grether e *Cajanus cajan* (L.) Huth com potencial para novos agentes terapêuticos.** 2022. 38 folhas. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2022.

## RESUMO

As plantas têm ganhado cada vez mais destaque pela grande fonte geradora de moléculas bioativas, sendo uma ótima alternativa natural para fabricação de novos medicamentos. Entretanto, ainda há questionamentos científicos sobre o uso, mecanismo de ação, posologia e indicações terapêuticas. De acordo com agências sanitárias, empresas farmacêuticas devem cumprir os critérios específicos de segurança para liberação de novos fármacos no mercado, recomendando os ensaios de citotoxicidade e de genotoxicidade, *in vivo* e *in vitro*, para detectar possíveis alterações celulares. Desse modo, a fim de verificar a segurança no uso dos extratos foliar etanólico e ácido, das espécies de *Mimosa candollei* R. Grether e *Cajanus cajan* L. Millsp, foi realizado ensaios citotóxico e genotóxico, com a linhagem celular de fibroblastos de camundongos (L929) através do teste de MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium]) e do teste de micronúcleo, respectivamente. O teste de MTT, foi realizado utilizando  $2 \times 10^4$  de células, as amostras foram distribuídas em diferentes concentrações e submetidas ao leitor de ELISA, espectrofotômetro, com filtro de 570 nm. Para a avaliação genotóxica, foi utilizada  $1 \times 10^6$  células por frascos de cultura que recebeu o tratamento em diferentes concentrações. A incubação foi feita utilizando frascos tratados com citocalasina B, a fim de interromper o ciclo de divisão celular para análise genotóxica dos extratos. De acordo com os resultados, a citotoxicidade foi observada na espécie *M. candollei*, a partir do extrato ácido, na concentração de 200  $\mu\text{g/mL}$  e no extrato etanólico, na concentração de 1600  $\mu\text{g/mL}$ . Na espécie *C. cajan*, os extratos ácido e etanólico, apresentaram citotoxicidade em 100 e 200  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. Além disso, o extrato ácido de *M. candollei* apresentou genotoxicidade na concentração de 100  $\mu\text{g/mL}$ , enquanto o extrato etanólico, nas concentrações 400 e 800  $\mu\text{g/mL}$ . A espécie *C. cajan*, ambos os extratos apresentaram genotoxicidade na concentração de 50  $\mu\text{g/mL}$ . Assim, os testes de citotoxicidade e genotoxicidade analisa a viabilidade celular, a quebra de cromossomos e mutações do genoma sob a exposição de agentes exógenos. Desse modo, destaca-se a importância de avaliar a segurança desses compostos como etapa fundamental para posterior avanço na elaboração de novos fármacos ou produtos promissores, sendo fundamental as etapas de testes *in vivo* (testes clínicos) para potencial uso por parte da indústria farmacêutica.

**Palavras-chave:** Mutagênese. Fabaceae. Viabilidade Celular.

MELO, Suyane de Deus. **Cytogenotoxic evaluation of extracts of *Mimosa candollei* R. Grether and *Cajanus cajan* (L.) Huth species with potential for new therapeutic agents.** 2022. 38 pages. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2022.

## ABSTRACT

Plants have gained increasing prominence for the great source of bioactive molecules, being a great natural alternative for the manufacture of new drugs. However, there are still scientific questions about the use, mechanism of action, dosage and therapeutic indications. According to health agencies, pharmaceutical companies must comply with specific safety criteria for releasing new drugs on the market, recommending cytotoxicity and genotoxicity assays, in vivo and in vitro, to detect possible cellular alterations. Thus, in order to verify the safety in the use of ethanolic and acid leaf extracts of *Mimosa candollei* R. Grether and *Cajanus cajan* L. Millsp species, cytotoxic and genotoxic assays were carried out with the mouse fibroblast cell line (L929 ) by the MTT test ([3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide]) and the micronucleus test, respectively. The MTT test was performed using  $2 \times 10^4$  cells, the samples were distributed in different concentrations and submitted to an ELISA reader, spectrophotometer, with a 570 nm filter. For the genotoxic evaluation,  $1 \times 10^6$  cells were used per culture flask that received the treatment at different concentrations. Incubation was performed using flasks treated with cytochalasin B, in order to interrupt the cell division cycle for genotoxic analysis of the extracts. According to the results, cytotoxicity was observed in the species *M. candollei*, from the acid extract, at a concentration of 200  $\mu\text{g/mL}$  and in the ethanol extract, at a concentration of 1600  $\mu\text{g/mL}$ . In the species *C. cajan*, the acid and ethanolic extracts showed cytotoxicity at 100 and 200  $\mu\text{g/mL}$ , respectively. In addition, the acid extract of *M. candollei* showed genotoxicity at a concentration of 100  $\mu\text{g/mL}$ , while the ethanolic extract, at concentrations of 400 and 800  $\mu\text{g/mL}$ . The species *C. cajan*, both extracts showed genotoxicity at a concentration of 50  $\mu\text{g/mL}$ . Thus, cytotoxicity and genotoxicity tests analyze cell viability, chromosome breakage and genome mutations under exposure to exogenous agents. Thus, the importance of evaluating the safety of these compounds is highlighted as a fundamental step for further advancement in the development of new drugs or promising products, with in vivo testing steps (clinical tests) being essential for potential use by the pharmaceutical industry.

**Key words:** Mutagenesis. Fabaceae. Cell viability.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	09
1.1	Plantas Medicinais .....	09
1.2	Família Fabaceae.....	10
1.2.1.	<i>Mimosa candollei</i> R. Grether.....	11
1.2.1.	<i>Cajanus cajan</i> (L.) Huth.....	13
1.3	Segurança de Uso.....	14
1.3.1	Avaliação citotóxica.....	15
1.3.2	Avaliação genotóxica .....	16
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	18
2.1	Objetivo Geral .....	18
2.2	Objetivos Específicos .....	18
<b>3</b>	<b>METODOLOGIA</b> .....	19
3.1	Extratos Vegetais .....	19
3.1.1	Material vegetal.....	19
3.1.2	Preparação dos extratos vegetais .....	19
3.1.3	Frações ácidas.....	20
3.2	Cultivo Celular.....	20
3.3	Teste do MTT.....	20
3.4	Ensaio do Micronúcleo com Bloqueio da Citocinese.....	21
3.5	Análise Estatística.....	22
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	23
3.1	Teste do MTT.....	23
3.2	Ensaio do Micronúcleo com Bloqueio da Citocinese.....	28
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	32
<b>6</b>	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	33

## 1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1.1 PLANTAS MEDICINAIS

Plantas medicinais são espécies vegetais que apresentam propriedades terapêuticas com um amplo espectro de uso para tratamentos não convencionais ou podem servir como adjuvantes ou como base para novos medicamentos, podendo ser usadas como compostos inspiradores para síntese de fármacos. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS, 2002) a população dos países em desenvolvimento utiliza práticas tradicionais em seus cuidados básicos de saúde e 85% usam plantas medicinais. Deste modo, a população brasileira tem uma longa tradição na utilização de plantas medicinais para o tratamento de diferentes doenças agudas e crônicas, sendo muitos princípios ativos isolados de plantas endêmicas dos mais diversos biomas brasileiros (SOUZA, 2013; DUTRA, 2016).

Diversos tecidos vegetais podem ser utilizados para beneficiar a população, como as folhas, frutas, flores, raízes, caule e sementes. Algumas das substâncias produzidas e armazenadas por esses tecidos, são conhecidas como compostos ativos que possuem efeitos fisiológicos nos organismos vivos, podendo atuar no tratamento de diversas doenças. Muitas espécies de plantas medicinais são conhecidas têm sido utilizadas em estudos (farmacêuticos, químicos e clínicos) para fabricação de medicamentos, como a aspirina, a partir da casca de salgueiro, a morfina, com o fruto da papoula e a quinina pela Cinchona (BARBOSA, 2008; HARVEY, 2008; JAMSHIDI-KIA, 2018; ERARSLAN, 2020).

Para garantir o acesso seguro das plantas medicinais e fitoterápicos aos usuários, facilitando sua inserção nos serviços de saúde, foi institucionalizada, em 2006, a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares e a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos que buscam tratamentos alternativos através de tecnologias eficazes e seguras, atestadas a partir do uso tradicional e que podem ser associadas às terapias convencionais (BRASIL, 2009).

Além disso, como outra medida de apoio e orientação ao uso de plantas terapêuticas, com ênfase na orientação à cadeia produtiva e estímulo ao desenvolvimento de pesquisas científicas com plantas medicinais no Brasil, em 2009, o Ministério da Saúde publicou a Relação Nacional de Plantas de Interesse ao

SUS (RENISUS), uma lista com 71 espécies vegetais com potencial terapêutico. Foram instituídas ainda as Farmácias Vivas no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS) pela Portaria nº 886, de 20 de abril de 2010 (BRASIL, 2010a).

Um marco legal na diferenciação do uso da droga vegetal com finalidade medicinal ou alimentícia, foi a implementação da Resolução de Diretoria Colegiada (RDC), de número 26, publicada em 2014, de ação regulatória, que administra e planeja estrategicamente as ações e padrões de qualidade de serviços e produtos da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Esta resolução define como plantas medicinais, as partes que contenham compostos bioativos, responsáveis pela ação terapêutica, após os processos de coleta ou colheita, estabilização e secagem. Por intermédio dessa RDC, a Anvisa passou a regular a produção, o comércio e o uso de drogas vegetais. Assim, a população pode utilizar como forma de produto industrializado, que tem estabelecidos e controlados requisitos de qualidade e segurança (BRASIL, 2010a; SOARES E MENDONÇA, 2010; ANVISA, 2014).

Apesar dos medicamentos fitoterápicos terem uma boa adesão da população ainda existem muitas preocupações sobre a segurança e eficácia de seu uso, pois muitas espécies de plantas possuem toxicidade. Desse modo, uma espécie pode ser inofensiva quando usada como alimento, mas pode ser nociva quando usada como medicamento, devido à dose relativamente alta administrada ou porque pode interagir com outros medicamentos, alimentos ou ainda relacionados a características intrínsecas do paciente, como alergias e intolerâncias. Segundo Miranda et al. (2021), entre os anos de 2010 e 2020, foram identificados 8052 casos de intoxicação por plantas no Brasil que foram notificados pelo, Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde (DATASUS) do Brasil, responsável por coletar, processar, administrar e disseminar informações sobre assistência à saúde, informações epidemiológicas, informações sobre a rede de assistência à saúde e outros indicadores de saúde. Neste sentido, percebe-se a importância de investigar a toxicidade de plantas e seus tecidos e/ou órgãos usados na medicina popular (ANNALI ITALIANI, 2000; ERNST, 2003; SOUZA, 2020).

## 1.2 FAMÍLIA FABACEAE

A família Fabaceae tem distribuição cosmopolita, sendo encontrada desde

florestas tropicais aos desertos, incluindo toda variação de relevos, dos Alpes às planícies. Até o momento, foram identificados cerca de 795 gêneros e mais de 19.500 espécies, representando uma das maiores famílias de angiospermas e uma das principais do ponto de vista econômico. Essas plantas são amplamente utilizadas nos setores farmacêutico, cosmético, alimentício e têxtil. Apresentam também propriedades terapêuticas promissoras provenientes das saponinas, compostos nitrogenados e compostos fenólicos. Apresentando atividade antimicrobiana, atividade antioxidante, atividade anti-inflamatória e antitumoral. Como por exemplo, a goma arábica, derivada das espécies *Acacia senegal* e *Acacia seyal*, bastante utilizada pela sua importante capacidade anti-inflamatória (ROMANO, 2013; LPWG, 2017; DZOYEM, 2018).

No Brasil, até o momento, foram registrados 208 gêneros e 2851 espécies da família Fabaceae, cujos 125 gêneros e 604 espécies são do bioma Caatinga, que cobre cerca de 60% do território nordestino, se estendendo até uma pequena parte do estado de Minas Gerais. A família Fabaceae possui características intrínsecas como presença de frutos em forma de vagem, embora haja exceções (MAGALHÃES, 2019; FLORA DO BRASIL, 2022).

### 1.2.1 *Mimosa candollei* R. Grether

*Mimosa* é o quinto gênero mais importante da família Fabaceae, com mais de 540 espécies pantropicais, pertencente a subfamília Mimosoideae. No Brasil, existe 374 espécies de gênero. A *Mimosa candollei* é uma espécie nativa e está presente em todas as regiões do país, distribuída nos domínios da Amazônia, Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica. Porém, não é endêmica do Brasil podendo ser encontrada em outras partes do mundo, como nos Estados Unidos e na Argentina (SIMON, 2011; DUTRA e MORIM 2015; FLORA DO BRASIL, 2022).

A *M. candollei*, geralmente, cresce até uma altura de subarbustos alcançando até um metro. O caule da mimosa é ereto, delgado, espinhoso e bem ramificado com folhas bipinadas. A espécie *M. candollei* é facilmente reconhecida por apresentar frutos lineares, cilíndricos, estriado aculeado. Tem o nome popular como 'maliça' ou 'malcinha da roça' (SARASWAT e POKHARKAR, 2012).



**Figura 1.** *Mimosa candollei* R. Grether (Fonte: Flora do Brasil, 2020).

As plantas desse gênero são bastante utilizadas pela medicina popular. Isso pode ser justificado pelas substâncias encontradas com mais frequência nessas plantas que são os flavonoides, quercetina, 7-O-metilquercetina, entre outros. Os flavonoides são substâncias com atividade biológica comprovada como antioxidante, anticancerígena, anti-inflamatória e antimicrobiana. Além disso, algumas plantas do gênero são utilizadas também na reabilitação de solos degradados devido sua capacidade de se desenvolver em condições adversas e de fixar nitrogênio nas raízes, gerada a partir de bactérias do gênero *Rizhobium*, como é o caso da espécie *Mimosa scabrella* Benth. (GAMA-RODRIGUES, 2008; SANTOS e GROSS, 2008; LIN, CHIOU e CHENG, 2011; AGUIAR, 2012; CITADINI-ZANETTE, 2017).

As aplicações tradicionais da *M. candollei* são representadas pelo uso medicinal popular para controle ou tratamento de várias doenças. Suas folhas são consumidas na forma de chás, cozidos e xaropes com indicações diuréticas, sedativas, contra artrite, bursite, entre outros. Vilela (2018) observou que o extrato etanólico foliar de *M. candollei* apresentou atividade antimicrobiana de 80 e 50 % para *Streptococcus pyogenes* e *Staphylococcus aureus*, respectivamente. Entretanto, testes *in vitro* sobre segurança e eficácia para o uso da espécie são importantes para avaliar os efeitos adversos ou processos alérgicos (SILVEIRA, 2012; VILELA, 2018; MAGALHÃES, 2020).

### 1.2.2 *Cajanus cajan* (L.) Huth

*Cajanus cajan*, tem como nome popular guandu, bóer, ervilha-de-angola, ervilha-do-congo, feijão-de-árvore e está entre as mais importantes culturas de leguminosas. Foi introduzida no Brasil e Guianas pela rota dos escravos procedentes da África, tornando-se largamente distribuída e naturalizada na região tropical, onde assumiu importância como fonte de alimento humano e forragem devido ao alto teor proteico (20 a 25 %) e por fornecer aminoácidos essenciais como tirosina, lisina e arginina (SEIFFERT e THIAGO, 1983; ODENY , 2007; MALLIKARJUNA, 2010; SAXENA, 2010, TAUNDE, 2018).

*Cajanus cajan* é uma planta arbustiva que atinge alturas entre 1,5 a 3,5 metros. Suas folhas são compostas, as flores, possuem coloração variada do amarelo e seus frutos são do tipo legume ou fava, também chamados de vagem, de formato achatado e curvilíneo, com sementes semelhantes a ervilhas, que podem ser lisas ou rajadas (SANTOS, 2017).



**Figura 2.** *Cajanus cajan* (L.) Huth (Fonte: VILELA, 2018).

O guandu é conhecido também por suas propriedades terapêuticas, sendo empregado na medicina tradicional indiana e brasileira, contra inúmeras doenças. Suas folhas e sementes são usadas na forma de xaropes, óleo essencial e cremes

no tratamento de hepatite, disenteria, diabetes e sarampo (HARRIS, 2014).

O extrato etanólico de suas folhas possuem atividade antimicrobianas contra *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus*, apresentando concentração mínima inibitória (MIC) de 3,13, 12,50, 400 e 100 mg/mL para cada microorganismo, respectivamente. Diante disso, com o intuito de diminuir os efeitos colaterais e de auxiliar no tratamento junto a medicamentos tradicionais, os compostos bioativos de origem vegetal são usados como modelo base para novos medicamentos a fim de superar a resistência de patógenos aos métodos tradicionais, sendo a análise mais profunda desses extratos, bastante necessária (EZEIFEKA, 2004; NWACHUKWU e UZOETO, 2010).

### 1.3 SEGURANÇA DE USO

Alguns compostos ativos podem danificar a estrutura celular dos organismos tratados e até atingir o DNA das células e mudanças no material genético do organismo, mesmo que possuam um sistema de reparo extremamente eficiente de autoproteção para manter a viabilidade celular. As células que carregam mutações prejudiciais à funcionabilidade celular são mais suscetíveis ao desenvolvimento de um processo carcinogênico. Os principais testes que podem, ou não, revelar os danos são os citotóxicos, genotóxicos, mutagênicos e carcinogênicos (ARAÚJO, 2016).

Após a descoberta do potencial medicinal de algumas espécies de plantas, testes pré-clínicos devem ser conduzidos para detectar possíveis efeitos adversos no organismo humano. Esses testes fornecem informações da toxicologia *in vivo* e *in vitro*, são eles toxicidade reprodutiva, toxicogenética, tolerância local, farmacodinâmica, carcinogenicidade, genotoxicidade, entre outros. Caso não detecte toxicidade, as chances de que a nova droga siga para os testes clínicos em humanos aumentam (FDA, 2010; EMA, 2013; SHEGOKAR, 2020).

No entanto, existem divergências na seleção da concentração máxima utilizada para testes *in vitro*. Os guias European Medicines Agency (EMA), Food and Drug Administration (FDA) recomendam concentrações máximas de 1 mM ou 500 µg/mL, enquanto a Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) recomenda 10 mM ou 5000 µg/mL. Junto a isso, em alguns casos, como extratos vegetais, a composição da substância testada não é bem definida (FDA,

2012; OECD, 2016).

Diante disso, a ANVISA e órgãos internacionais como EMA, FDA e a OECD aconselham que os promissores materiais vegetais devem ser submetidos a ensaios citogenotóxicos para avaliar a segurança de uso e determinar doses que possam induzir efeitos colaterais (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006; FDA, 2016; OECD, 2016).

### 1.3.1 Avaliação Citotóxica

Os ensaios de citotoxicidade avaliam a viabilidade celular e possíveis alterações na estrutura celular após a exposição a um determinado composto. Em geral, há a utilização de corantes ou reagentes que atuam como marcadores enzimáticos da integridade da membrana, permitindo a identificação de alterações celulares causadas pelo processo de morte celular induzida. Medidas foram implementadas pela OECD para padronizar a interpretação dos resultados e a realização dos testes para aumentar a confiabilidade e a aceitabilidade dos dados, gerando padrões para medir a citotoxicidade e garantir a concentração limite (OECD, 2015).

Dentre os testes de avaliação da citotoxicidade *in vitro*, alguns merecem destaque, como o ensaio MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio brometo), o método de absorção do vermelho neutro, o ensaio sulfo-rodamina B e o teste de lactato desidrogenase. Eles são necessários para definir doses e concentrações para testes *in vitro* complementares e, são recomendado pela ISO 10993-5-2009 (ISO, 2009; ARAÚJO, 2016; MILLER, 2017).

O teste de MTT é baseado na medição da viabilidade das células através da atividade metabólica. O brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio, amarelo solúvel em água, é metabolicamente reduzido a formazan insolúvel em azul-violeta. O número de células viáveis correlaciona-se com a cor determinada por medições fotométricas, após a dissolução do formazan em álcool (ISO, 2009).

A importância desses testes é observada em estudos de extratos vegetais, os quais, mesmo possuindo efeito antimicrobiano, podem apresentar uma citotoxicidade para as linhagens celulares testadas. Neste sentido, alguns trabalhos descritos na literatura avaliaram a ação antimicrobiana, como é o caso de Makhafola *et al.* (2014) que observou uma ação não seletiva do extrato etanólico das folhas da espécie *Ochna* sp., onde apresentou citotoxicidade nas linhagens Vero (células de rim de

macaco), células de carcinoma hepatocelular humano (C3A) e células da derme bovina, nas concentrações que apresentaram 50% das células mortas (LC<sub>50</sub>) de valores variando de 0,026 a 0,099 mg/ml, sendo concentrações menores que aquelas que tinham efeito antimicrobiano. Logo, esses extratos apresentam riscos para uso terapêutico. Do mesmo modo, Silva *et al.* (2020) observou que altas concentrações, como 250, 500 e 1000 µg/mL dos extratos etanólicos da casca das espécies de *Mimosa* foram capazes de causar hemólise em sangue de camundongo, mesmo sendo concentrações de valores superiores aos observados para as atividades biológicas, há o risco no seu uso sem estudos prévios como é recomendado.

### 1.3.2 Avaliação Genotóxica

O equilíbrio entre os efeitos terapêuticos e os efeitos genotóxicos é importante para verificar sua aplicabilidade como um medicamento farmacológico. Testes de genotoxicidade avaliam a capacidade da droga em interagir e induzir possíveis alterações ao DNA na forma de mutações gênicas e alterações cromossômicas (HABAS, 2017; TAYLOR, 2019).

A genotoxicidade pode ser avaliada em modelos *in vitro* e *in vivo*. De acordo com a diretriz M3 (R2) (2013) da EMA, os testes *in vitro* que podem ser utilizados para verificar a genotoxicidade são o teste Ames e um dos testes em células de mamíferos (mutação gênica em linfoma de camundongos, ensaio cometa, aberrações cromossômicas ou o teste do micronúcleo). Porém, se for avaliar algum antimicrobiano, o teste Ames é inviabilizado, uma vez que esse teste envolve um microorganismo, a *Salmonella typhimurium* (ARAÚJO, 2016).

O ensaio de micronúcleo (MN) analisa o potencial genotóxico através das alterações cromossômicas, micronúcleos, brotos nucleares e pontes nucleoplasmáticas, além de detectar apoptose, necrose e citotoxicidade através da proporção de células mono-, bi- e multinucleadas. A OECD aconselha que este ensaio seja realizado sob bloqueio de citocinese, uma vez garantida a exposição da droga candidata a um ou mais ciclo celulares. A metodologia MN é simples quando comparado com outros métodos para avaliação da genotoxicidade, o que torna um procedimento econômico, mesmo sendo um método que demanda mais tempo de experimento e na análise dos dados (FENECH, 2007; OECD, 2016).

Segundo Silva *et al.* (2020), o extrato etanólico da casca de *M. tenuiflora* que é tradicionalmente usado contra bronquite, tosse, febre, dor de cabeça e úlceras externas, também observaram que o ensaio de micronúcleo não apresenta genotoxicidade significativa, indicando não haver toxicidade genética, ou seja, sendo seguro para seguir com testes clínicos. Por outro lado, Medeiros *et al.* (2008) observou que os testes realizados em ratas grávidas que se alimentaram de ração com 10% de sementes da espécie *M. tenuiflora*, seus fetos apresentaram teratogenicidade, indicando que a espécie pode causar efeitos mutagênicos. Diante disso, destaca-se a importância da continuidade nos estudos sobre esse gênero, pois há particularidades frente a alguns tipos de órgãos e tecidos da planta e a linhagem celular testada. Além da importância para uma possível etapa de utilização mais segura tanto na medicina popular e/ou até como alternativa para criação de novos fármacos, quando utilizadas.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial citogenotóxico dos extratos, ácido e etanólico, das espécies *Mimosa candollei* R. Grether e *Cajanus cajan* L. Millsp.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a citotoxicidade de extratos, ácido e etanólico, e das frações ácidas das espécies *M. candollei* e *C. cajan*, mediante o teste de viabilidade celular MTT em cultura de células;
- Analisar o potencial genotóxico dos extratos através do teste de micronúcleo com bloqueio de citocinese;
- Indicar concentrações citogenotóxicas para outros testes *in vitro* que sejam preconizados pelas agências regulamentadoras.

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 EXTRATOS VEGETAIS

##### 3.1.1 Material vegetal

O material vegetal das espécies *Mimosa candollei* e *Cajanus cajan* foi cedido pelo Laboratório de Genética e Biotecnologia Vegetal da Universidade Federal de Pernambuco (LGBV/UFPE). O material foi coletado no município de Paudalho no estado de Pernambuco, Brasil (49° NE 7°57'35" S 35°6'18" O). Ambas as espécies selecionadas foram identificadas pelo Dr. Marcus Alves do Departamento de Botânica da UFPE e as exsiccatas foram depositadas no herbário UFP – Geraldo Mariz, da mesma instituição, sob os números de voucher 78.921 e 78.924, respectivamente.

##### 3.1.2 Preparação dos extratos vegetais

Foi utilizada a parte aérea da espécie *M. candollei* e as folhas de *C. cajan* para obtenção dos extratos, bem como das respectivas frações.

Para a extração etanólica, o material vegetal foi seco a 45°C e triturado em um moinho de facas Wiley TE-650/1 Thecnal até obtenção de um pó fino. Para a extração ácida, o material vegetal foi moído em pó fino sob maceração utilizando nitrogênio líquido.

Os extratos etanólicos foram obtidos de acordo com Vilela (2018), sendo o material em pó submerso em álcool etílico (70%) em um percolador, onde foram realizadas quatro trocas a cada dois dias (totalizando 8 dias). A solução foi posteriormente filtrada com papel de filtro 0,45 mm (microporo). O filtrado foi evaporado até a secura usando um evaporador rotativo (Modelo MV 10, IKA). Aproximadamente 5 mg de cada extrato etanólico foi ressuspenso em etanol absoluto até uma concentração final de 5 mg/mL, submetidos a vórtex, sonicação em banho aquecido a 50 °C e centrifugados.

A extração ácida foi também realizada de acordo com Vilela (2018). O material em pó (5 g) foi extraído usando 50 mL de tampão de água contendo 10% de ácido acético por 1 h a 50°C, sob agitação. O homogenato foi removido por filtração

e o sobrenadante clarificado por centrifugação a 7000x g durante 30 min a 4°C. O pH foi medido e o material armazenado a -20°C.

### 3.1.3 Frações ácidas

A obtenção das frações ácidas de *M. candollei* e *C. cajan* foi de acordo com Vilela (2018). O sobrenadante obtido da extração ácida foi injetado (em alíquotas de 1 ou 2 mL por vez) em cartuchos de fase reversa SepPak C18 descartáveis, e frações separadas foram coletadas. Para permitir um monitoramento mais eficiente e separação de frações (cerca de 6 ml cada), as eluições não foram realizadas isocraticamente por injeção de seringa do eluente, mas sim os cartuchos foram modificados para montagem em um sistema GE Aktä HPLC, monitorado a 214 nm, e aplicado um gradiente de 0-100% de acetonitrila (0,05% TFA) em 17,5 min.

## 3.2 CULTIVO CELULAR

Para realização dos experimentos de citotoxicidade e genotoxicidade foi utilizado a linhagem celular de fibroblastos de camundongos L929, obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro e cultivadas com meio DMEM (Gibco™, Grand Island, NY, USA), suplementado com soro fetal bovino (SFB) 10% (Gibco) e solução de antibiótico-antimicótico (penicilina 10.000 Unid/mL, estreptomicina 10 mg/mL e anfotericina B (0,25 µg.mL<sup>-1</sup>) Cultilab). Os frascos cultivados foram mantidos em atmosfera úmida, a 37°C e com 5% de CO<sub>2</sub>. A concentração celular para os testes de MTT foi de 2x10<sup>4</sup> e para o teste do micronúcleo de 1x10<sup>6</sup>.

## 3.3 TESTE DO MTT

O teste do MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium]) foi realizado em placas de ELISA de 96 poços, sendo utilizados 2x10<sup>4</sup> células por poço, segundo a metodologia descrita por Mosmann (1983) e Araújo et al. (2015b). Para a obtenção da suspensão celular, as células foram lavadas com solução tampão fosfato-salino (phosphate buffered saline – PBS) para remoção do meio de cultivo. Posteriormente, foi adicionado 2 mL tripsina 0,5% durante 5 min, assim as células foram desprendidas do frasco. Em seguida, a tripsina foi inativada com meio

DMEM suplementado com SFB, 2 mL. A suspensão resultante foi transferida para o tubo Falcon estéril e centrifugado por 8 min a 1500 rpm. O sobrenadante foi desprezado, e o *pellet* ressuspenso com 1 mL de meio DMEM suplementado. 20  $\mu$ L da solução celular foi colocada em um eppendorf junto com 20  $\mu$ L do corante azul de tripan, as células não viáveis (membranas rompidas) permitem que o corante entre e as deixem coradas, assim, através da câmara de *new bauer* apenas as células viáveis (descoradas) são contabilizadas.

Desse modo, cada poço da placa de Elisa teve  $2 \times 10^4$  de células, as placas foram incubadas em estufa a 37% com 5% de CO<sub>2</sub> por 24 horas, para estabilização das células. Após o tempo de incubação, as células foram expostas em diferentes concentrações, as placas foram incubadas por mais 24 horas. Sendo as concentrações de 0,78, 1,56, 3,12, 6,25, 12,5, 25, 50, 100, 200, 400, 800 e 1,600  $\mu$ g/mL para o extrato ácido e para o etanólico de *Mimosa candollei*, foram utilizadas 0,78, 1,56, 3,12, 6,25, 12,5, 25, 50, 100, 200  $\mu$ g/mL para *Cajanus cajan*. Foi utilizado DMEN para controle negativo (CN) e o Triton X-100 a 1% para o controle positivo (CP). No teste de MTT do extrato etanólico, foi realizado como controle solvente (CS, 1 etanol: 1 DMEM, v/v), a fim de obter dados mais fidedignos do extrato, em 0,78, 1,56, 3,12, 6,25, 12,5, 25, 50, 100, 200, 400, 800 e 1,600  $\mu$ g/mL. As concentrações utilizadas foram baseadas em testes anteriores e diante da quantidade disponibilizada em laboratório, desse modo, foi-se optado em iniciar os experimentos com concentrações baixas em relação aos testes anteriores.

Para o tratamento das frações dos extratos *M. candollei* e *C. cajanus*, as células foram tratadas com as concentrações de 0,78 a 200  $\mu$ g/mL. Após o período de incubação as células foram então submetidas ao tratamento de MTT, onde foi adicionado 20  $\mu$ L por poço. Assim, as placas foram incubadas em estufa por 24 horas a 37°C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, mais uma vez. Posteriormente, o material sobrenadante foi descartado logo em seguida. Para análise, foi adicionado 100  $\mu$ L de DMSO (Dimetil sulfoxido) em cada poço, dissolvendo o pellet no fundo dos poços, as placas foram submetidas ao leitor de ELISA, no qual foram medidas espectrofotometricamente com comprimento de onda a 570 nm.

#### 3.4 TESTE DO MICRONÚCLEO COM BLOQUEIO DE CITOCALASINA B (CBMN)

O teste de micronúcleo foi realizado segundo Fenech (2020), com algumas

modificações. Utilizando  $1 \times 10^6$  células por frascos/garrafas de cultura celular. As células foram tratadas em 12,5, 25, 50, e 100  $\mu\text{g/mL}$  para o extrato ácido e nas concentrações 200, 400 e 800  $\mu\text{g/mL}$  para o etanólico de *M. candolei*. Para os extratos ácido e etanólico de *C. cajan* foram utilizadas as concentrações de 12,5, 25, 50  $\mu\text{L}$ . Em seguida, os frascos com células tratadas foram incubados por 48 horas em estufa a 37% com 5% de  $\text{CO}_2$ . No controle negativo foi usado meio DMEN e para o controle positivo (CP) o metanossulfonato de metila (MMS,  $4 \times 10^{-2}$   $\mu\text{g/mL}$ ; CAS 66-27-3, Sigma-Aldrich). Posteriormente, foi adicionado em cada frasco, 50  $\mu\text{L}$  de citocalasina B a 300  $\mu\text{g/mL}$  (solução de uso) e 5 mL de meio suplementado. Os frascos foram incubados por mais 28 h em estufa a 37 °C. Em seguida, o meio de cultura foi armazenado em tubos Falcons, previamente identificados. As células aderidas nos frascos de cultivo foram lavadas com solução PBS 1X para remoção do meio de cultivo, descartado. Então, foi adicionado 2 mL tripsina 0,5% durante 5 min. Assim as células foram desprendidas do frasco e para inativação da enzima foi utilizado meio DMEM suplementado, 2 mL. A suspensão resultante foi transferida para o tubo Falcon estéril e centrifugada à 1500 rpm por 8 minutos. O sobrenadante foi descartado e adicionado 5 mL de fixador Carnoy (metanol:ácido acético; 3:1). A suspensão foi centrifugada à 1500 rpm por 8 minutos, descartado o sobrenadante e adicionado, novamente, 5 mL do fixador. As lâminas foram coradas com DAPI/glicerol (4', 6-diamidino-2-fenilindol) para análise em microscópio de fluorescência. O experimento foi realizado em triplicata e de cada réplica foram confeccionados três lâminas. Na análise das lâminas, foram quantificados a média de micronúcleos (MN), brotos nucleares (NB) e pontes nucleoplasmáticas (NPB).

### 3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com três repetições para a atividade citotóxica e para a atividade genotóxica. Para a análise da citotoxicidade e genotoxicidade dos extratos, foi adotado o teste de Kruskal-Wallis, uma vez que os dados não apresentaram distribuição normal, usando o software Statística 8.0. Para a análise de citotoxicidade das frações ácidas, foi utilizado o teste de comparação múltipla de Student-Newman-Keuls (SNK). Foi considerado um nível de significância de 5 % ( $p > 0,05$ )

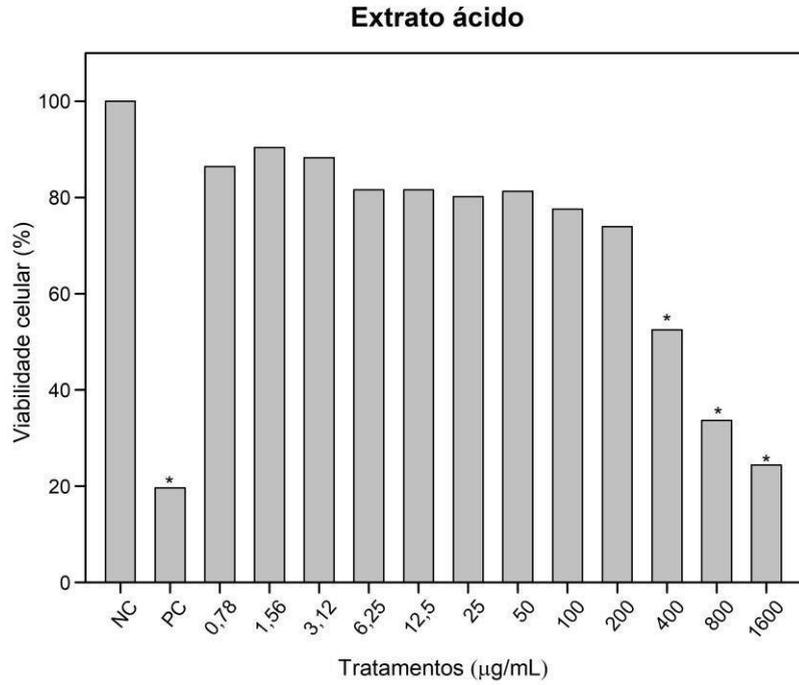
## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 TESTE DO MTT

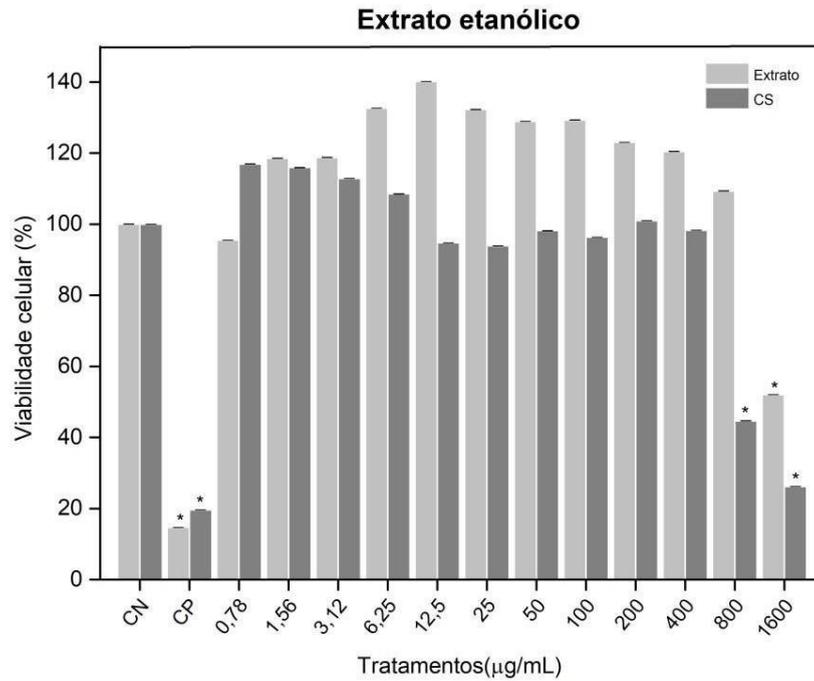
Os testes de citotoxicidade avaliam alterações na integridade celular, apoptose, necrose e a capacidade de prejudicar a função das organelas vitais da célula, geralmente utilizando corantes atuando como marcadores enzimáticos. O ensaio colorimétrico MTT, por exemplo, é baseado na função mitocondrial, onde ocorre a redução do sal tetrazólio em sal de formazan de violeta em células viáveis, de uma substância solúvel a outra insolúvel. Este teste é um dos principais testes para definição das concentrações para testes futuros *in vitro* (FDA 2013; EMA 2013; ARAÚJO, 2016; VAJRABHAYA, 2018; ASCHRAFI, 2021).

Foi observado no teste de MTT para o extrato foliar ácido de *M. candollei* (figura 3) uma redução na viabilidade celular sendo estatisticamente citotóxico em nas concentrações de 400 (77,54%) a 1600 µg/mL (24,40%). Enquanto o extrato etanólico de *M. candollei* (figura 4), houve citotoxicidade apenas na maior concentração testada 1600 µg/mL (52,03%). O controle do solvente etanólico (CS) foi citotóxico para as concentrações de 800 (44,70%) e 1600 µg/mL (26,20%). Nesse caso, pode supor um efeito protetor para a concentração de 800 µg/mL, onde houve aumento na viabilidade celular (109,35 %) em relação ao resultado do MTT do solvente etanólico. Para o resultado da fração ácida (figura 5), houve uma discreta queda na viabilidade celular na concentração 6,25 µg/ml, porém, não apresentou citotoxicidade.

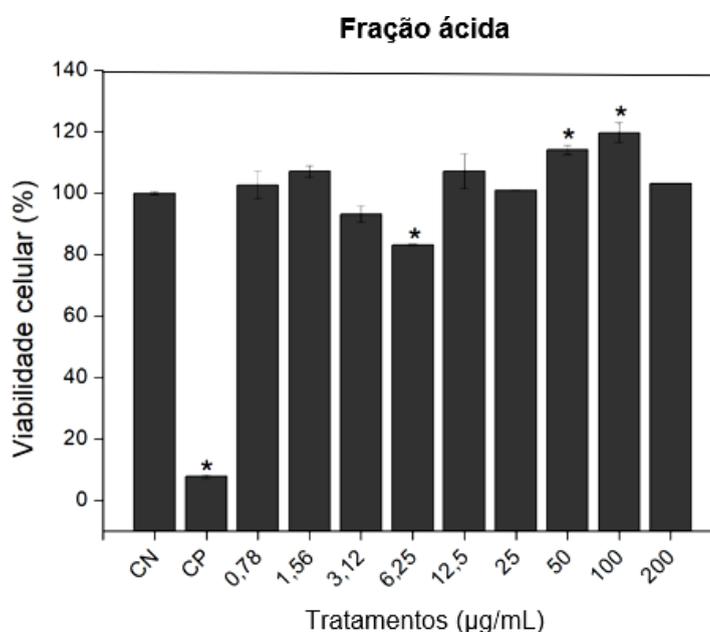
A hipótese é de um possível efeito protetor contra os danos induzidos pelo solvente citotóxico e, conseqüentemente, o aumento da viabilidade celular. Podendo ter como explicação um aumento da suplementação dos constituintes químicos presentes no extrato. Uma análise química parcial do extrato etanólico, encontrada na literatura, mostrou a presença de substâncias tais como flavonoides, quercetina, entre outros, que possuem atividade biológica comprovada como antioxidante, anticancerígena, anti-inflamatória, antimicrobiana. Foi observado no trabalho de Magalhães *et al.* (2018), a fração do extrato etanólico de *Mimosa tenuiflora* com maior potencial antioxidante não apresentou citotoxicidade em células Vero (células de rins de macacos) na maior concentração testada (512,6 µg/mL) (AGUIAR, 2012; VILELA, 2018; SILVA, 2021).



**Figura 3** - Viabilidade celular das células L929 expostas a diferentes concentrações do extrato ácido de *Mimosa candollei* (0,78 a 1600 µg/mL) mediante ensaio do MTT. Os valores e barras correspondem a média e desvio padrão da porcentagem da viabilidade celular, respectivamente. CN (controle negativo); CP (controle positivo Triton X). \*Porcentagem média estatisticamente diferentes quando comparadas com o controle negativo pelo teste Kruskal-Wallis.



**Figura 4** - Viabilidade celular das células L929 expostas a diferentes concentrações do extrato etanólico de *Mimosa candollei* (0,78 a 1600 µg/mL) mediante ensaio do MTT (cinza claro) e a viabilidade celular do solvente etanólico (0,78 a 1600 µg/mL) mediante ensaio do MTT (cinza escuro). Os valores e barras correspondem a média e desvio padrão da porcentagem da viabilidade celular, respectivamente. CN (controle negativo); CP (controle positivo Triton X); CS: Controle Solvente. \*Porcentagem média estatisticamente diferentes quando comparadas com o controle negativo pelo teste Kruskal-Wallis.

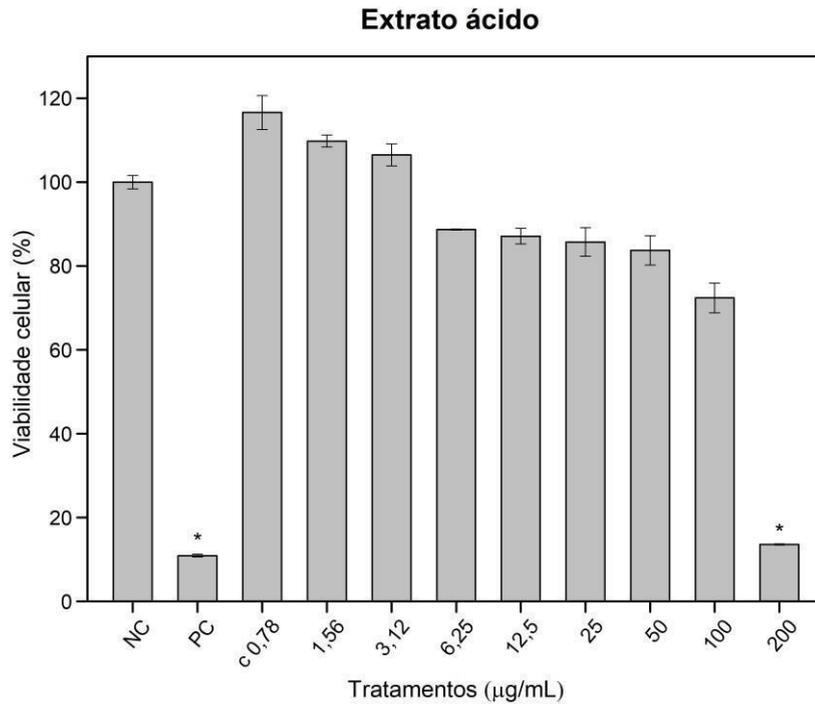


**Figura 5** - Viabilidade celular das células L929 expostas a diferentes concentrações da fração ácida de *Mimosa candollei* (0,78 a 200 µg/mL) mediante ensaio do MTT. Os valores e barras correspondem a média e desvio padrão da porcentagem da viabilidade celular, respectivamente. CN (controle negativo); CP (controle positivo Triton X). \*Porcentagem média estatisticamente diferentes quando comparadas com o controle negativo pelo teste Newman-Keuls.

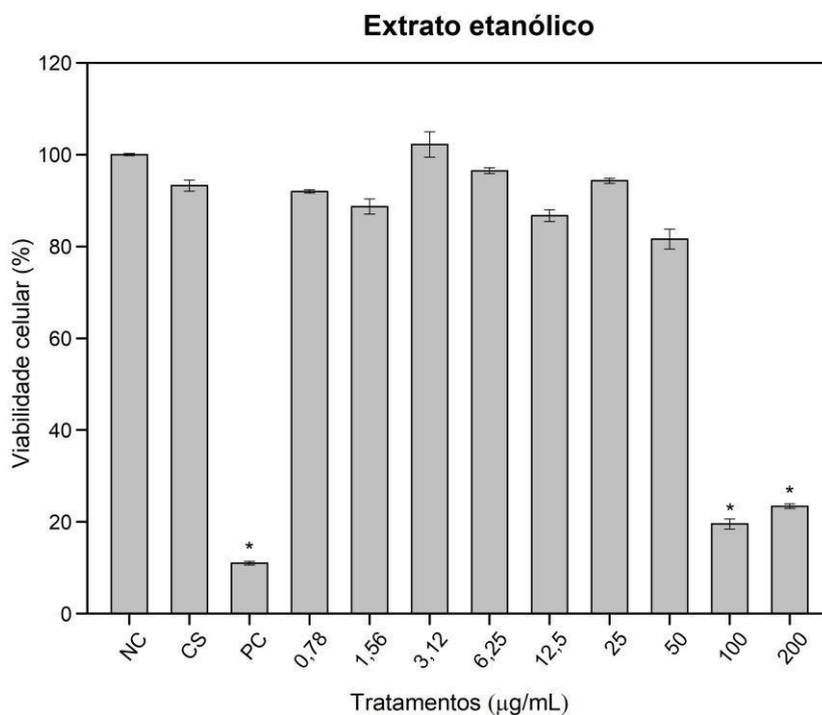
Para a espécie *Cajanus cajan*, a citotoxicidade do extrato ácido (figura 6) se deu apenas na concentração de 200 µg/mL (13,58 %), quando comparada ao controle negativo. Assim como no extrato etanólico (figura 7) da mesma espécie, a citotoxicidade se deu nas duas maiores concentrações testadas de 100 (19,53 %) e 200 µg/mL (23,42 %). O CS não foi citotóxico para nenhuma concentração testada, assim não houve interferência. Na fração ácida de *C. cajan* (figura 8) não apresentou citotoxicidade e suas concentrações apresentaram viabilidade celular acima de 100% de forma significativa, levantando a hipótese que este aumento pode ter relação direta dos compostos bioativos com atividade antioxidante presente na amostra (WU, 2009; MICELI, 2015).

De modo semelhante, o estudo de Rerk-Am *et al.* (2014) avaliou o extrato alcalino de *C. cajan* em concentrações de 1000, 500, 400, 300, 200, 100, 50, 25 e

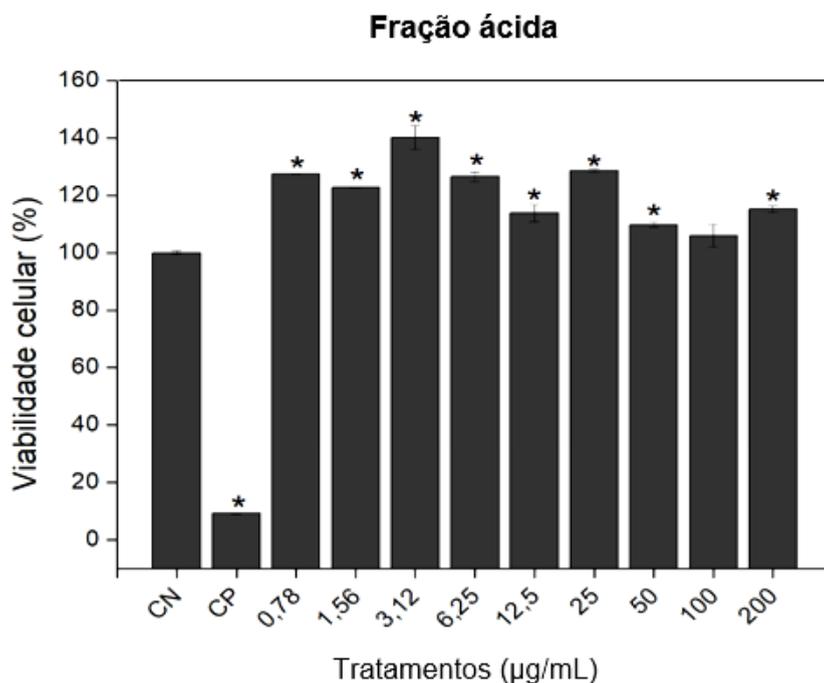
12,5 µg/ml sob teste de citotoxicidade MTT e observou que as células NHFF, fibroblastos dérmicos humanos, não apresentaram citotoxicidade.



**Figura 6** - Viabilidade celular das células L929 expostas a diferentes concentrações do extrato ácido de *Cajanus cajan* (0,78 a 200 µg/mL) mediante ensaio do MTT. Os valores e barras correspondem a média e desvio padrão da porcentagem da viabilidade celular, respectivamente. CN (controle negativo); CP (controle positivo Triton X). \*Porcentagem média estatisticamente diferentes quando comparadas com o controle negativo pelo teste Kruskal-Wallis



**Figura 7** - Viabilidade celular das células L929 expostas a diferentes concentrações do extrato etanólico de *Cajanus cajan* (0,78 a 200 µg/mL) mediante ensaio do MTT. Os valores e barras correspondem a média e desvio padrão da porcentagem da viabilidade celular, respectivamente. CN (controle negativo); CP (controle positivo Triton X); CS: Controle Solvente. \*Porcentagem média estatisticamente diferentes quando comparadas com o controle negativo pelo teste Kruskal-Wallis



**Figura 8** - Viabilidade celular das células L929 expostas a diferentes concentrações da fração ácida de *Cajanus cajan* (0,78 a 200 µg/mL) mediante ensaio do MTT. Os valores e barras correspondem a média e desvio padrão da porcentagem da viabilidade celular, respectivamente. CN (controle negativo); CP (controle positivo Triton X). \*Porcentagem média estatisticamente diferentes quando

comparadas com o controle negativo pelo teste Newman-Keuls.

Os resultados de MTT dos extratos das espécies *M. candollei* e *C. cajan* são uma fonte promissora de novos agentes terapêuticos. Pois, na literatura, esses extratos apresentaram atividade antimicrobiana (contra os patógenos *S. aureus*, *S. pyogenes*, *E. coli*, entre outros na concentração de 10 mg/mL) e antioxidante significativa e estão associados com baixa citotoxicidade, como representados nos resultados deste trabalho (SARAIVA, 2015; VILELA, 2018).

#### 4.2 TESTE DO MICRONÚCLEO COM BLOQUEIO DE CITOCALASINA B (CBMN)

O ensaio de micronúcleo com bloqueio de citocalasina B é um dos testes de genotoxicidade mais utilizados em estudos *in vitro*. Os micronúcleos se originam de fragmentos cromossômicos resultantes da quebra do DNA ou de cromossomos inteiros resultantes do atraso cromossômico durante a anáfase, que não são incluídos nos núcleos filhos principais durante a divisão nuclear. Assim, os micronúcleos refletem a exposição a agentes que possam ou não causar a quebra de cromossomos e mutações do genoma (FENECH, 2011; PUKALSKIENĖ et al., 2018).

Foi observado que o resultado do ensaio de MN do extrato ácido de *M. candollei*, em comparação ao controle negativo, (tabela 1) apresentou genotoxicidade na concentração de 100 µg/mL. Para o extrato etanólico, a genotoxicidade apareceu nas duas maiores concentrações testadas 400 e 800 µg/mL. Enquanto para os extratos ácido e etanólico de *C. cajan*, apresentaram genotoxicidade na maior concentração testada, 50 µg/mL (tabela 2).

Foi observado no trabalho de Silva *et al.* (2013) que através dos testes cometa e micronúcleo, foi possível verificar as atividades antigenotóxicas do extrato e da fração de folhas de *M. caesalpinifolia*. Ainda de acordo com Silva *et al.* (2013), o extrato na concentração de 125 mg/kg inibiu o dano oxidativo do DNA nas células hepáticas dos animais intoxicados com cádmio (Cd). Além disso, a fração diminuiu o dano genômico e a mutagênese induzida pela exposição ao cádmio. Assim como no estudo de Sanchez *et al.* (2016), que utilizou a decocção de folhas de *C. cajan* obtendo seu extrato, apresentou efeitos anticlastogênicos, pois houve a diminuição do número de micronúcleos em camundongos brancos tratados com tetraciclina

Desse modo, os gêneros parecem ser capazes de modular os efeitos tóxicos causados pela exposição de substâncias danosas.

**Tabela 1:** Alterações genotóxicas na linhagem celular L929 pelo teste MN com bloqueio de citocalasina B da espécie *Mimosa candollei* R.Grether.

Extrato <i>M. candolei</i>	Alterações	Tratamentos µg/mL	Média ± Desvio padrão
Ácido	MN	CN	8,89 ± 0,99 a
		CP	<b>68,44 ± 1,71 b</b>
		100	<b>16,00 ± 1,56 b</b>
		50	14,11 ± 2,03 a
		25	13,44 ± 1,34 a
		12,5	10,00 ± 1,89 a
		NBUDs	CN
	CP		<b>23,00 ± 1,89 b</b>
	100		<b>10,89 ± 1,37 b</b>
	50		<b>10,00 ± 1,22 b</b>
	25		5,33 ± 0,94 a
	12,5		6,67 ± 1,49 a
	NPBs	CN	0,33 ± 0,47 a
		CP	<b>2,78 ± 0,92 b</b>
		100	0,56 ± 0,50 a
		50	0,22 ± 0,44 a
		25	0,22 ± 0,42 a
		12,5	0,11 ± 0,31 a
	Alterações totais ± DP	CN	13,55 ± 1,49 a
		CP	<b>94,22 ± 1,87 b</b>
		100	<b>27,44 ± 1,83 b</b>
50		24,33 ± 1,56 a	
25		19,00 ± 1,05 a	
12,5		16,77 ± 2,52 a	
Etanólico	MN	CN	8,89 ± 0,99 a
		CP	<b>68,44 ± 1,71 b</b>
		800	<b>32,89 ± 1,85 b</b>
		400	<b>20,00 ± 1,94 b</b>
		200	10,56 ± 1,89 a
	NBUDs	CN	4,33 ± 0,94 a
		CP	<b>23,00 ± 1,89 b</b>
		800	8,56 ± 1,57 a
		400	8,44 ± 1,50 a
		200	7,89 ± 1,66 a

<b>NPBs</b>	CN	0,33± 0,47 a
	CP	<b>2,78 ± 0,92 b</b>
	800	0,89 ± 0,87 a
	400	0,89 ± 0,57 a
	200	0,22 ± 0,42 a
<b>Alterações totais ± DP</b>	CN	13,55 ± 1,49 a
	CP	<b>94,22 ± 1,87 b</b>
	800	<b>42,33 ± 2,00 b</b>
	400	<b>29,33 ± 2,58 b</b>
	200	18,66 ± 3,49 a

CN: Controle Negativo (apenas meio de cultura); CP: Controle Positivo (metanossulfonato de metila;  $2 \times 10^{-4}$  M); MN: micronúcleo; NBUD: broto nuclear; NPB: pontes nucleoplasmática; DP: Desvio Padrão. Valores seguidos de letras diferentes em uma mesma coluna diferem estatisticamente entre si pelo teste de Kruskal-wallis ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 2:** Alterações genotóxicas na linhagem celular L929 pelo teste MN com bloqueio de citocalasina B da espécie *Cajanus cajan* L. Millsp.

Extrato <i>C. cajan</i>	Alterações	Tratamentos	Média ± Desvio padrão
		µg/mL	
Ácido	<b>MN</b>	CN	14,67 ± 1,89 a
		CP	<b>79,89 ± 1,91 b</b>
		50	<b>36,78 ± 1,72 b</b>
		25	23,00 ± 1,49 a
		12,5	14,44 ± 1,95 a
	<b>NBUDs</b>	CN	6,56 ± 1,83 a
		CP	<b>21,56 ± 1,83 b</b>
		50	10,56 ± 1,94 a
		25	<b>13,11 ± 1,66 b</b>
		12,5	8,22 ± 1,87 a
	<b>NPBs</b>	CN	0,78± 0,63 a
		CP	2,22 ± 0,92 a
		50	0,67 ± 1,00 a
		25	0,56 ± 0,68 a
		12,5	0,44 ± 0,50 a
<b>Alterações totais ± DP</b>	CN	22,00 ± 3,12 a	
	CP	<b>103,66 ± 2,82 b</b>	
	50	<b>48,00 ± 2,21 b</b>	
	25	36,66 ± 1,69 a	
	12,5	23,11 ± 1,79 a	
<b>Etanólico</b>	<b>MN</b>	CN	14,67 ± 1,89 a
		CP	<b>79,89 ± 1,91 b</b>
		50	<b>35,22 ± 1,31 b</b>
		25	22,67 ± 1,89 a
		12,5	15,67 ± 1,49 a

<b>NBUDs</b>	CN	6,56 ± 1,83 a
	CP	<b>21,56 ± 1,83 b</b>
	50	10,67 ± 1,63 a
	25	8,78 ± 1,47 a
	12,5	6,33 ± 1,63 a
<b>NPBs</b>	CN	0,78 ± 0,63 a
	CP	2,22 ± 0,92 a
	50	1,67 ± 1,05 a
	25	1,00 ± 1,25 a
	12,5	0,33 ± 0,67 a
<b>Alterações totais ± DP</b>	CN	22,00 ± 3,12 a
	CP	<b>103,66 ± 2,82 b</b>
	50	<b>47,55 ± 2,49 b</b>
	25	32,44 ± 2,83 a
	12,5	22,33 ± 1,24 a

CN: Controle Negativo (apenas meio de cultura); CP: Controle Positivo (metanossulfonato de metila;  $2 \times 10^{-4}$  M); MN: micronúcleo; NBUD: broto nuclear; NPB: pontes nucleoplasmática; DP: Desvio Padrão. Valores seguidos de letras diferentes em uma mesma coluna diferem estatisticamente entre si pelo teste de Kruskal-wallis ( $p < 0,05$ ).

A fim de correlacionar os resultados obtidos neste trabalho com alguns obtidos na literatura, foi observado que as espécies aqui trabalhadas possuem abundância em substâncias provenientes do grupo dos flavonoides em sua composição química, que apresentam atividade antioxidante. Baldim et al. (2017) mostra que em altas concentrações, compostos antioxidantes, apresentam duplo efeito, protetor e mutagênico, contribuindo para atividade pró-oxidante na geração de radicais livres que danificam o DNA. Sugerindo, assim, a causa da citotoxicidade e a genotoxicidade nas maiores concentrações testadas. (AGUIAR, 2012; GRUJICIC, 2020).

## 5 CONCLUSÃO

A avaliação citotóxica, através do teste de MTT, dos extratos das espécies *Mimosa candollei* R. Grether e *Cajanus cajan* L. Millsp apresentou citotoxicidade apenas nas maiores concentrações testadas, permitindo, assim, identificar as concentrações não citogenotóxicas para outros testes *in vitro* necessários à fabricação de novos fármacos, como testagem em outras linhagens celulares.

O ensaio de micronúcleo com bloqueio de citocalasina B (CBMN) dos extratos de *Mimosa* e *Cajanus*, identificou genotoxicidade apenas na maior concentração testada, através da presença de micronúcleo, brotos e pontes nucleares.

Por fim, destaca-se a importância dos estudos científicos desses extratos que mostraram bastante potencial para possíveis medicamentos. Porém, não exclui a preocupação e a necessidade de alertar a população sobre uso destas espécies pela população. Servindo, assim, de alerta para a necessidade de estudos mais detalhados sobre sua interação com os compostos bioativos de forma isolada e material genético.

## REFERÊNCIAS

AGUIAR, R. M.; ALVES, C. Q.; DAVID, J. M.; REZENDE, L. C.; LIMA, L. S.; DAVID, J. P.; QUEIRÓZ, L. P. Antioxidant activities of isolated compounds from stems of *Mimosa invisa* Mart. ex Colla. **Química Nova**, [s. l.], v. 35, p. 567-570, 2012.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução da Diretoria Colegiada- RDC nº 10**, de 09 de Março de 2010.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução da Diretoria Colegiada- RDC nº 26**, de 13 de Maio de 2014.

ARAÚJO S. S., FERNANDES C. C. T., MARIN-MORALES M. A., BRASILEIRO-VIDAL A.C. AND BENKO-ISEPPON, A. M. Mutagenicity, Genotoxicity and Cytotoxicity Assays of Medicinal Plants: First Step for Drug Development. **Therapeutic Medicinal Plants: From Lab to the Market**. p. 130-153, 2016.

ASCHRAFI, A., ZUPIN, L., VILELA, L.M.B., SANTOS-SILVA, C.A., ROLDAN-FILHO, R.S., LIMA, L.M., LIMA, C.S.A., PETIX, V., TOSSI, A., BARBOSA, L.L., BENKO-ISEPPON, A.M., CROVELLA, S. Antimicrobial and cytotoxic properties of extracts from plants traditionally used in North-East Brazil. **Journal Pharmacol Phytochem Ethnomed** 16: 21–32.

AZANI, N. et al. Legume Phylogeny Working Group (LPWG). A new subfamily classification of the Leguminosae based on a taxonomically comprehensive phylogeny. **Taxon**, [s. l.], v. 66, p. 44-77, 2017.

BALDIM J.L., ALCÂNTARA B.G.V. DE, DOMINGOS O.D.S., SOARES M.G., CALDAS I.S., NOVAES R.D., OLIVEIRA T.B., LAGO J.H.G., CHAGAS-PAULA D.A., The correlation between chemical structures and antioxidant, prooxidant, and antitrypanosomatid properties of flavonoids. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**. 2017 (2017) 3789856.

BARBOSA, D. B. Avaliação das atividades antimicrobiana, antioxidante e análise preliminar da mutagenicidade do extrato aquoso das folhas de *Anacardium humile* St. Hill. (Anacardiaceae). 82 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2008.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da diretoria colegiada - RDC nº 67, de 8 de outubro de 2007. Dispõe sobre boas práticas de manipulação de preparações magistrais e oficinais para uso humano em farmácias, incluindo medicamento fitoterápico manipulado. Brasília: **Diário Oficial da União**, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Gabinete do Ministro. Portaria nº 886, de 20 de abril de 2010a. Institui a Farmácia Viva no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS). Brasília, **Diário Oficial da União**, 20 abr 2010a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Política Nacional De Práticas Integrativas e Complementares no SUS: atitude de ampliação de acesso / Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à

Saúde. Departamento de Atenção Básica. Brasília: **Ministério da Saúde**, 2006b. 92 p.: il.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. Política Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos / Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica. – Brasília: **Ministério da Saúde**, 2006a. 60 p. – (Série B. Textos Básicos de Saúde) Programa Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos (Portaria Interministerial N° 2.960, de 09 de dezembro de 2008).

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. RENISUS – Relação Nacional de Plantas Mediciniais de Interesse ao SUS. DAF/SCTIE/MS, fev/2009.

CHRISTENHUSZ, M. J. M, BYNG JW. The number of known plants species in the world and its annual increase. **Phytotaxa**, v. 261, n. 201, p. 10.11646. 2016.

CITADINI-ZANETTE, V., NEGRELLE, R. R. B., LEAL-FILHO, L. S., REMOR, R., ELIAS, G. A., & SANTOS, R. *Mimosa scabrella* benth. (Fabaceae) enhances the restoration in coal mining areas in the atlantic rainforest. **Cerne**, 23(1), 103–114, 2017.

DO BRASIL, F. (2020). em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. **Flora do Brasil**. Disponível em:< <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>>. Acesso em, 22.

DUTRA, R. C; CAMPOS, M. M.; SANTOS, A. R. S; CALIXTO, J. B. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacological Research**, 112, p. 4–29, 2016 doi:10.1016/j.phrs.2016.01.021

DUTRA, V.F., MORIM, M.P. Mimosa. In Lista de Espécies da Flora do Brasil. Rio de Janeiro: **Instituto Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. 2015

DZOYEM, J. P., TCHAMGOUE, J., TCHOUANKEU, J. C., KOUAM, S. F., CHOUDHARY, M. I., BAKOWSKY, U. Antibacterial activity and cytotoxicity of flavonoids compounds isolated from *Pseudarthria hookeri* Wight & Arn.(Fabaceae). **South African journal of botany**, v. 114, p. 100-103, 2018.

ERARSLAN, Z; ECEVIT-GENÇ, G; KÜLTÜR, Ş. Medicinal Plants Traditionally Used To Treat Skin Diseases In Turkey - Eczema, Psoriasis, vitiligo. **Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara University**, 44 (1), p. 137-166, 2020.

ERNST, E. Complementary medicine: Where is the evidence? **The Journal of Family Practice**, v. 52(8), p. 630, 2003.

EZEIFEKA, G. O.; ORJI, M. U.; MBATA, T. I.; PATRICK, A. O. Antimicrobial activities of *Cajanus cajan*, *Garcinia kola* and *Xylopiya aethiopica* on pathogenic microorganisms. **Biotechnology**, 3(1), 41- 43, 12 ago. 2004.

FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. **Nature protocols**, v. 2, n. 5, p. 1084-1104, 2007.

FENECH, M., KNASMUELLER, S., BOLOGNESI, C., HOLLAND, N., BONASSI, S., KIRSCH-VOLDERS. Micronuclei as biomarkers of DNA damage, aneuploidy, inducers of chromosomal hypermutation and as sources of pro-inflammatory DNA in humans. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 786, p. 2020.

GAMA-RODRIGUES, E. F.; GAMA-RODRIGUES, A. C.; PAULINO, G.; FRANCO, A. A. Atributos químicos e microbianos de solos sob diferentes coberturas vegetais no norte do estado do Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, [s. l.], v. 32, p. 1521-1530, 2008.

GRUJICIC, D., MARKOVIC, A., VUKAJLOVIC, J. T., STANKOVIC, M., JAKOVLJEVIC, M. R., CIRIC, A. MILOSEVIC-DJORDJEVIC, O. Genotoxic and cytotoxic properties of two medical plants (*Teucrium arduini* L. And *Teucrium flavum* L.) in relation to their polyphenolic contents. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, 503168. (2020).

HARVEY, A L. Natural products in drug discovery. **Drug Discov Today**, 13 (19-20):894-901., 2008.

ICH, FDA. M3 (R2) Nonclinical Safety Studies for the Conduct of Human Clinical Trials and Marketing Authorization for Pharmaceuticals Q&A. **Guideline**, v. 14, p. 84-86, 2013.

ISO 10993-5:2009 Biological Evaluation of Medical Devices. Part 5: Tests for In Vitro Cytotoxicity; **International Organization for Standardization**. Geneva, Switzerland, 2009.

JAMSHIDI-KIA, F., LORIGOOINI, Z.; HOSSEIN, A-K. Medicinal plants: Past history and future perspective. **Journal of Hermed Pharmacology**, p. 7, 2018.

LEWIS, G. P.; SCHRIRE, B.; MACKINDER, B.; LOCK, M. Legumes of the World. **Royal Botanic Gardens Kew**, UK, 2005

LIN, L.; CHIOU, C.; CHENG, J. 5-Deoxyflavones with Cytotoxic Activity from *Mimosa diplotricha*. **Journal of Natural Products**, [s. l.], v. 74, p. 2001-2004, 2011.

MAGALHÃES, F.E.A.; BATISTA, F.L.A.; SERPA, O.F.; MOURA, L.F.W.G.; LIMA, M.D.C.L.; DA SILVA, A.R.A.; GUEDES, M.I.F.; SANTOS, S.A.A.R.; DE OLIVEIRA, B.A.; NOGUEIRA, A.B. Orofacial antinociceptive effect of *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poiret. **Biomed. Pharmacother.** 2018, 97, 1575–1585.

MAGALHÃES, K. N.; BANDEIRA, M. A. M.; MONTEIRO, M. **Plantas medicinais da caatinga do nordeste brasileiro: etnofarmacopeia do Professor Francisco José de Abreu Matos**. 220 f. Tese (Doutorado em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos) - Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza. 2020.

MAJEED, I., RIZWAN, K., ASHAR, A., RASHEED, T., AMAROWICZ, R., KAUSAR, H., MARCEANU, L. G. A comprehensive review of the ethnotraditional uses and biological and pharmacological potential of the genus *mimosa*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 14, p. 7463, 2021.

MAKHAFOLA, T. J.; MCGAW, L. J.; ELOFF, J. N. *In vitro* cytotoxicity and genotoxicity of five *Ochna* species (Ochnaceae) with excellent antibacterial activity. **South African Journal of Botany**, v. 91, p. 9-13, 2014.

MALLIKARJUNA, N.; SAXENA, K. B.; JADHAV, D. R. *Cajanus*. In: Wild crop relatives: genomic and breeding resources. **Springer**, Berlin, Heidelberg, 2011. p. 21-33.

MANNUCCI, P. M. Annali Italiani di medicina interna: present and future Annali Italiani di Medicina Interna. **Organo Ufficiale Della Societa Italiana di Medicina Interna**, [s. l.], 10, p. 213-214, 1995. PMID: 8718653.

MEDEIROS, R. M. T.; FIGUEIREDO, A. P. M.; BENÍCIO, T. M. A.; DANTAS, F. P. M.; RIET-CORREA, F. Teratogenicity of *Mimosa tenuiflora* seeds to pregnant rats. **Toxicon**, [s. l.], v. 51, p. 316-319, 2008.

MELO, D. B., MACEDO, L. M., ALMEIDA, I. O., PEREIRA, T. R. S., SILVA, T. M., LEAL, M. M. T., MELO, G.E., SANTANA, L. L. B. Intoxicação por plantas no Brasil: uma abordagem cienciométrica. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 4, p. 40919-40937, 2021.

MICELI, N., BUONGIORNO, L. P., CELI, M. G., CACCIOLA, F., DUGO, P., DONATO, P., TAVIANO, M. F. Role of the flavonoid-rich fraction in the antioxidant and cytotoxic activities of *Bauhinia forficata* Link. (Fabaceae) leaves extract. **Natural Product Research**, 30(11), 1229–1239. 2015.

MILLER, F., HINZE, U., CHICHKOV, B., LEIBOLD, W., LENARZ, T., PAASCHE. Validation of eGFP fluorescence intensity for testing *in vitro* cytotoxicity according to ISO 10993-5. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 105, n. 4, p. 715-722, 2017.

MIRANDA, C. C. S.; SILVA, E. M. T.; BRITO, A. O.; ALVES, M. H. P.; SILVA, M. S. D.; SOUSA, L. L. A.; MORAIS, R. S.; RODRIGUES, A. F. A.; SILVA, W. G.; TORRES, D. S. B.; BIANCARDI, L.; LEMOS, Y. F. M.; FARIAS, N. L. S.; SOBRINHO, W. D.; SILVA, G. F. O.; MARQUES, G. W.; LOPES, E. L. Perfil epidemiológico das intoxicações por plantas notificadas no Brasil no período de 2010 a 2020. **Revista de Casos e Consultoria**, [s. l.], v. 12, n. 1, 2021.

NUNES, X. P.; MESQUITA, R. F.; SILVA, D. A.; LIRA, D. P.; COSTA, V. C. O.; SILVA, M. V. B.; XAVIER, A. L.; DINIZ, M. F. F. M.; AGRA, M. F. Constituintes químicos, avaliação das atividades citotóxica e antioxidante de *Mimosa paraibana* Barneby (Mimosaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [s. l.], v. 18, p. 718-723, 2008.

NWACHUKWU, E.; UZOETO, H.. Antimicrobial activities of leaf of *Vitex doniana* and *Cajanus cajan* on some bacteria. **Researcher**, [s. l.], v. 2, n. 3, p. 37-47, 2010.

ODENY, D. A. The potential of pigeonpea (*Cajanus cajan* (L.) Millsp.) in Africa. In: **Natural resources forum**. Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd, p. 297-305. 2007.

OECD (2015) Guidance Document on Revisions to OECD Genetic Toxicology Test Guidelines. 2015.

OECD (2016). TG 487: *In Vitro* Mammalian Cell Micronucleus Test. 2016.

RERK-AM, U., LAOVITTHAYANGGOON, S., KONGSOMBAT, B., TANGSATIRAPAKDEE, S., BANCHONGLIKITKUL, C. Anti-oxidant and cytotoxic activity of *Cajanus cajan* (L) Millsp alkaline extracts. **I10 Determination of D-saccharic acid-1, 4-lactone (DSL) in fermentation tea (Kombucha) by capillary electrophoresis**, p. 198-201. 2014.

ROMANO B., PAGANO E., MONTANARO V., FORTUNATO A.L, MILIC N., BORRELLI F. Novel insights into the pharmacology of flavonoids. **Phytotherapy research**, v. 27, n. 11, p. 1588-1596, 2013.

SAHU, M.; VERMAAND, D.; HARRIS, K. K. Phytochemical analysis of the leaf, stem and seed extracts of *Cajanus Cajan* L (Dicotyledoneae: Fabaceae). **World Journal Of Pharmacy And Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 3, n. 8, p. 694-733, 2014.

SANCHEZ, G. C., TANQUILUT, N. C., TANQUILUT, M. R. C., SORIANO JUNIOR, H. R., MULA, M. G., MULA, R. P. Anticlastogenic potential of pigeonpea (*Cajanus cajan* (L.) Millsp.) in white mice (*Mus musculus* L.). **Green Farming**, 07 (02). pp. 357-360. 2016.

SANTOS A. V. C., CORDEIRO S Z., GUAISTI, M.G. Herbário Prof. Jorge Pedro Pereira Carauta (HUNI) Coleção Didática Do Canto Das Flores. Brasil, Rio de Janeiro (RJ), **Rio de Janeiro Centro Cultural Fundação Progresso - Canto das Flores**.

SARASWAT, R.; POKHARKAR, R. GC-MS Studies of *Mimosa pudica*. **International Journal of PharmTech Research**, [s. l.], v. 4, p. 93-98, 2012.

SEIFFERT, N. F.; THIAGO, L. R. L. S. Legumineira: cultura forrageira para produção de proteína: guandu (*Cajanus cajan*). Circular Técnica 13. **EMBRAPA-CNPGC**, 52p, 1983.

SHEGOKAR, Ranjita. Preclinical testing—Understanding the basics first. In: **Drug Delivery Aspects**. Elsevier, 2020. p. 19-32.

SILVA, I. D. D. L., OLIVEIRA, F. S. M. D., ANDRADE, M. F. D., BRITO, A. M. S. S., HALLWASS, F., VINHAS, G. M. Avaliação das potencialidades dos extratos vegetais de jurema preta (*Mimosa tenuiflora*) e cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) para uso em embalagens ativas antimicrobianas e antioxidantes. **Matéria (Rio de Janeiro)**. 2021, v. 26, n. 01 ISSN 1517-7076.

SILVA, S. A. DE N. M., BARROS, A. B., SOUZA, J. M. T., MOURA, A. F., ARAÚJO, A. R. DE, MENDES, M. G. A.; MARINHO FILHO, J. D. B. Phytochemical and biological prospection of *Mimosa* genus plants extracts from Brazilian northeast. **Phytochemistry Letters**, v.39, p.173–181. 2020.

SILVA, V. A., GONÇALVES, G. F., PEREIRA, M. S., GOMES, I. F., FREITAS, A. F., DINIZ, M. F., PESSÔA, H. L. Assessment of mutagenic, antimutagenic and genotoxicity effects of *Mimosa tenuiflora*. **Revista brasileira de farmacognosia**, v. 23, n. 2, p. 329-334, 2013.

SILVEIRA, J. C., BUSATO, N. V., COSTA, A. O. S., COSTA JUNIOR, E. F. Levantamento e análise de métodos de extração de óleos essenciais. **Enciclopédia Biosfera**, v. 8, n. 15, 2012.

SIMON, M.F., GREYER, R., QUEIROZ, L.P., SARKINEN, T.E., DUTRA, V.F.; HUGHES, C.E. The evolutionary history of *Mimosa* (Leguminosae): Toward a phylogeny of the sensitive plants. **American Journal of Botany**, <http://www.amjbot.org>, v. 98, n. 7, p. 1201–1221, 1 jul. 2011.

SINHA, M., MANNA, P., SIL, P.C. Attenuation of cadmium chloride induced cytotoxicity in murine hepatocytes by a protein isolated from the leaves of the herb *Cajanus indicus* L.. *Arch Toxicol* 81, 397–406 (2007).

SOARES, E. I; MENDONÇA, L. G. Chá ou fitoterápico? Um resgate histórico de como a legislação sanitária encara a planta medicinal desde o Brasil colônia. **Perspectivas da Ciência e Tecnologia**, v. 2, n. 1/2, p. 20-31, 2020.

SOUZA, C. M.; BRANDÃO, D. O; SILVA, M. S. P; PALMEIRA, A. C; SIMÕES, M. O. S; MEDEIROS, A. C. D. Utilização de plantas medicinais com atividade antimicrobiana por usuários do serviço público de saúde em Campina Grande - Paraíba. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, 15(2), p. 188–193, 2013. doi:10.1590/s1516-05722013000200004

TAUNDE, C. A.; JOSÉ, J.; FERRAZ, T. Influência do feijão bóer (*Cajanus Cajan*) sobre o desempenho zootécnico da tilápia do Nilo (*Oreochromis Niloticus*) em substituição da soja como fonte proteica em alimentos alternativos dos peixes no distrito de Nicoadala, Província da Zambézia. 2018. **Dissertação (Mestrado ESCMC) - UEM**, Quelimane, 2018.

VAJRABHAYA, L.O., KORSUWANNAWONG, S. Cytotoxicity evaluation of a Thai herb using tetrazolium (MTT) and sulforhodamine B (SRB) assays. **Journal of Analytical Science and Technology**, v. 9, n. 1, p. 1-6, 2018.

VILELA, L. M. B, DOS SANTOS-SILVA, C. A., ROLDAN-FILHO, R. S., DA SILVA, P. M., DE OLIVEIRA LIMA, M., DA SILVA ARAÚJO, J. R., BENKO-ISEPPON, A. M. Approaches for Identification and Validation of Antimicrobial Compounds of Plant Origin: A Long Way from the Field to the Market. In: **Eco-Friendly Biobased Products Used in Microbial Diseases**. CRC Press, 2022. p. 183-222.

VILELA, L. M. B. Seleção de genes das classes PR para obtenção de peptídeos antimicrobianos (AMPs) a partir de plantas da família Fabaceae. 2018. 130 f. **Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Pernambuco**, Recife, 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO. The Importance of Pharmacovigilance - Safety Monitoring of medicinal products 2002.

WU, N., FU, K., FU, Y. J., ZU, Y. G., CHANG, F. R., CHEN, Y. H., LIU, X. L., KONG, L., LIU, W., GU, C. B. Antioxidant activities of extracts and main components of pigeonpea [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.] leaves. **Molecules**, v. 14, n. 3, p. 1032-1043, 2009.