

---

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
(BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR)**

---

**AVALIAÇÃO DE ATIVIDADES TÓXICAS, QUIMIOPROTETORA E  
QUIMIOPREVENTIVA DO EXTRATO NEBULIZADO DE CASCAS DE *Ximenia  
americana* L. SOBRE O ORGANISMO TESTE *Mus musculus***

JAQUELINE APARECIDA DE OLIVEIRA DALAVILLA

Tese apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista, Campus de Rio Claro, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Ciências Biológicas, área de Biologia Celular e Molecular.

**Rio Claro - SP  
2018**

**AVALIAÇÃO DE ATIVIDADES TÓXICAS, QUIMIOPROTETORA E QUIMIOPREVENTIVA DO EXTRATO NEBULIZADO DE CASCAS DE *Ximenia americana* L. SOBRE O ORGANISMO TESTE *Mus musculus***

JAQUELINE APARECIDA DE OLIVEIRA DALAVILLA

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Aparecida Marin-Morales

Co-Orientadora: Prof. Dr. Ana Claudia Dantas de Medeiros

Tese apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista, Campus de Rio Claro, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutora em Ciências Biológicas, área de Biologia Celular e Molecular.

**Rio Claro- SP**

**Setembro/2018**

D136a

Dalavilla, Jaqueline Aparecida de Oliveira

Avaliação de atividades tóxicas, quimioprotetora e quimiopreventiva do extrato nebulizado de cascas de *Ximenia americana* L. sobre o organismo teste *Mus musculus* / Jaqueline Aparecida de Oliveira Dalavilla. -- Rio Claro, 2018  
120 p. : tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Rio Claro

Orientadora: Maria Aparecida Marin-Morales

Coorientadora: Ana Claudia Dantas de Medeiros

1. Biologia Celular. 2. Planta medicinal. 3. Toxicidade oral. 4. Mutagenicidade. 5. Quimioprevenção. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências, Rio Claro. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Rio Claro



**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

TÍTULO DA TESE: AVALIAÇÃO DE ATIVIDADES TÓXICAS, QUIMIOPROTETORA E QUIMIOPREVENTIVA DO EXTRATO NEBULIZADO DE *Ximenia americana* L. SOBRE O ORGANISMO TESTE *Mus musculus*

**AUTORA: JAQUELINE APARECIDA DE OLIVEIRA DALAVILLA**

**ORIENTADORA: MARIA APARECIDA MARIN MORALES**

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR), pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. MARIA APARECIDA MARIN MORALES  
Departamento de Biologia / IB Rio Claro

Prof. Dr. EDSON LUIS MAISTRO  
Departamento de Fonoaudiologia / FFC Marília

Profa. Dra. FERNANDA OLIVEIRA DE GASPARI DE GASPARI  
x / Fundação Hermínio Ometto

Profa. Dra. PATRICIA ROSA DE OLIVEIRA  
Pós-Doutoranda do Departamento de Biologia / IB Rio Claro

Prof. Dr. FELIPE HUGO ALENCAR FERNANDES  
x / UNIFACISA

Rio Claro, 26 de setembro de 2018

Título alterado para: "Avaliação de atividades tóxicas, quimioprotetora e quimiopreventiva do extrato nebulizado de cascas de *Ximenia americana* L. sobre o organismo teste *Mus musculus*"

*“Dedico este trabalho ao meu esposo Diego, por ter sonhado e caminhado ao meu lado e ao meu filho Pedro, por me mostrar alegria nas pequenas coisas e pelo amor incondicional”.*

"A alegria está na luta, na tentativa, no sofrimento envolvido e não na vitória propriamente dita."

Mahatma Gandhi

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus por permitir que pessoas maravilhosas façam parte da minha vida, fazendo de mim uma pessoa melhor.

À meu esposo Diego pelo amor, apoio, respeito e principalmente por mais uma vez ter caminhado ao meu lado para a realização deste sonho.

À meu filho Pedro por me mostrar a beleza do amor incondicional, obrigada por fazer dos meus dias mais felizes, você e o papai são o bem mais precioso que tenho na vida.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho” e ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, por todo suporte técnico e financeiro.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Ap. Marin-Morales, por ter me aceito mais uma vez em seu grupo de pesquisa, pela orientação neste trabalho, pelos conselhos, apoio, dedicação, exemplo de ética, profissionalismo e de pessoa.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Claudia Dantas de Medeiros, pela Co-orientação, por todo suporte concedido e a todos os seus alunos envolvidos no desenvolvimento do extrato utilizado neste trabalho.

A todo departamento de biologia, professores, funcionários, pessoas amigas, que fazem dos nossos dias mais felizes.

A Seção técnica de Pós-graduação, em especial ao Felipe e Ivana.

A toda equipe do Centro de Convivência Infantil (CCI-Unespinha), em especial a “tia Flavinha” que sempre cuidou muito bem do meu Pedro para que pudesse retomar minhas atividades acadêmicas, obrigada pelo carinho e dedicação.

Ao Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup>. Rodrigo Juliano Oliveira da UFMG, que nos forneceu gentilmente, mais uma vez a DMH.

À Adriana Correia, técnica do laboratório de Mutagênese, sempre muito prestativa, obrigada pela ajuda nas atividades do laboratório, por me socorrer sempre que preciso e pela agradável companhia diária.

Ao Gerson Souza, técnico do laboratório de histologia, pela ajuda com preparo de soluções.

Aos colegas mutagênicos: Cleiton, Dânia, Fernanda, Franco, Laís, Leticia`s (Bulascoschi, Gigeck, Gonçalves e Rocha), Maria Tereza, Márcia, Matheus, Michele, Mileni, Nádia, Patrícia, Raquel, Samantha, Tamara, Willian, obrigada pela companhia, pelas risadas e principalmente pelo apoio e ajuda sempre que necessário.

À Michele pela ajuda com as análises estatísticas.

Ao Franco, Roberta e Tatiane pela gentil ajuda nos dias de eutanásia, muito obrigada, sem vocês eu não teria dado conta.

Aos colegas do laboratório da citogenética, pela companhia, fazendo com que nossos dias no laboratório fossem harmoniosos.

À banca examinadora, por todas as contribuições feitas neste trabalho.

A todos aqueles que porventura não tenham sido citados, mas que com certeza contribuíram de forma importante para a realização deste trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001



## RESUMO

*Ximenia americana* L., conhecida popularmente no Brasil como ameixa-do-mato, ameixa-brava ou ameixa-do-sertão. É pertencente a família Olacaceae. Considerando seu uso bem propagado na medicina popular, seus efeitos descritos na literatura e os componentes presentes neste extrato, o presente trabalho avaliou os efeitos do extrato nebulizado das cascas do caule de *X. americana* L. na toxicidade aguda, subaguda e crônica, bem como seus efeitos ainda não reportados na literatura como potencial citotóxico, mutagênico em células da medula óssea através do ensaio de micronúcleo, sua resposta imunológica em leucócitos circulantes através do ensaio de contagem diferencial de leucócitos e o efeito carcinogênico e/ou anticarcinogênico em câncer colorretal induzido pela 1,2-dimetilhidrazina (DMH) em organismos teste camundongos *Mus musculus*. Na avaliação da toxicidade aguda de acordo com as orientações do guia OECD 423/2001, nenhuma toxicidade grave ou mortalidade foram observadas nas concentrações de 50, 150, 250, 500 e 2000 mg/kg, classificando o extrato com baixa toxicidade, foi observado uma diminuição significativa na massa relativa dos órgãos como: coração, fígado, pulmão, rins, testículos e tireóide. Estes resultados podem estar relacionados aos constituintes fitoquímicos tais como com potencial pró-oxidantes presentes no extrato como flavonoides, saponinas, antraquinonas, alcaloides, e terpenoides que em altas concentrações podem levar a danos oxidativos. À partir desse estudo foram selecionadas três concentrações para o teste de toxicidade subaguda (150, 250 e 350 mg/kg/dia), de acordo com orientações OECD 407/2008 não foram observados sinais de toxicidade aos animais, tampouco efeito citotóxico ou mutagênico pelo ensaio de micronúcleo em medula óssea de camundongos *Mus musculus* seguindo o guia OECD 474/2016. A toxicidade crônica do extrato nebulizado de *X. americana* L. foi avaliada com base no protocolo do guia OECD 452/2009, nas concentrações de 50, 150, 250 e 350 mg/kg, não foi observado sinais de toxicidade ou possível potencial citotóxico e mutagênico de acordo com o guia OECD 474/2016. Na avaliação do efeito quimioprotetor e quimiopreventivo do extrato nebulizado de *X. americana* L. em células da linhagem branca tais como os leucócitos não demonstraram alterações no processo inflamatório, foi possível observar uma diminuição na formação de FCA (lesões pré-neoplásicas) consideradas como marcadores do câncer de cólon, o extrato testado neste estudo teve uma ação quimioprotetora e quimiopreventiva no câncer colorretal induzido pelo DMH. Acredita-se que esse efeito seja devido aos constituintes fitoquímicos presentes neste extrato, tais como taninos condensados, flavonoides, ácido gálico, epicatequina, catequina, quercetina, lignanas, monoterpênicos, sesquiterpênicos, diterpênicos, naftoquinonas, triterpênicos e esteroides, já que muitos desses fitoquímicos são reportados na literatura científica como de ação anticancerígena.

**Palavras-chave:** Dose Letal 50%; citotoxicidade; mutagenicidade; carcinogenicidade; anticarcinogenicidade; focos de criptas aberrantes.

## ABSTRACT

*Ximenia americana* L., known in the popularly in Brazil as ameixa-do-mato, ameixa-brava or ameixa-do-sertão. It belongs to the family Olacaceae. Considering its well-publicized use in folk medicine, its effects described in the literature and the components present in this extract, the present work evaluated the effects of the nebulized extract of *X. americana* L. stem bark on acute, subacute and chronic toxicity, as well as its effects not yet reported in the literature as a cytotoxic potential, mutagenic in bone marrow cells through the micronucleus assay, its immune response in circulating leukocytes through the differential leukocyte counting assay, and the carcinogenic and / or anticarcinogenic effect in colorectal cancer induced by 1,2-dimethylhydrazine (DMH) in test organisms *Mus musculus* mice. In the acute toxicity assessment according to the Guideline OECD 423/2001, no serious toxicity or mortality was observed at the concentrations of 50, 150, 250, 500 and 2000 mg / kg, classifying the extract with low toxicity, a significant decrease in the relative mass of organs such as: heart, liver, lung, kidneys, testes and thyroid. These results may be related to the phytochemical constituents such as pro-oxidants present in the extract such as flavonoids, saponins, anthraquinones, alkaloids, and terpenoids that at high concentrations can lead to oxidative damage. Based on this study, three concentrations were selected for the subacute toxicity test (150, 250 and 350 mg / kg / day), according to Guideline OECD 407/2008 no signs of toxicity were observed in the animals, neither cytotoxic nor mutagenic Micronucleus assay in bone marrow of *Mus musculus* mice following the Guideline OECD 474/2016. Chronic toxicity of the nebulized *X. americana* L. extract was evaluated based on the protocol of Guideline OECD 452/2009 at concentrations of 50, 150, 250 and 350 mg / kg, no signs of toxicity or potential cytotoxic potential were observed, and mutagenic according to Guideline OECD 474/2016. In the evaluation of the chemoprotective and chemopreventive effect of *X. americana* L. nebulized extract in white blood cells such as leukocytes did not show changes in the inflammatory process, it was possible to observe a decrease in the formation of FCA (pre-neoplastic lesions) considered as markers of the colon cancer, the extract tested in this study had a chemoprotective and chemopreventive action in colorectal cancer induced by DMH. It is believed that this effect is due to phytochemical constituents present in this extract, such as condensed tannins, flavonoids, gallic acid, epicatechin, catechin, quercetin, lignans, monoterpenes, sesquiterpenes, diterpenes, naphthoquinones, triterpenes and steroids, since many of these phytochemicals are reported in the scientific literature as anticancer action.

**Keywords:** Lethal Dose 50%; cytotoxicity; mutagenicity; carcinogenicity; anticarcinogenicity; foci of aberrant crypts.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

% RD- Porcentagem de Redução de Danos

AOM- Metabólito o azoximetano

CA- Criptas Aberrantes

CCR- Carcinogênese Colorretal

CD- Contagem Diferencial de Leucócitos

COX-2- Cicloxigenase- 2

CYP2E1- Citocromo P450 2E1

DL50%- Dose Letal 50%

DMH- 1,2-dimetilhidrazina

DNA- Ácido Desoxirribonucleico

EDTA- Ácido etilenodiamino tetra-acético

EROs- Espécies Reativas de Oxigênio

ERNs- Espécies Reativas de Nitrogênio

FCA- Focos de Criptas Aberrantes

INCA- Instituto Nacional do Câncer

MN- Micronúcleo

NCE- Eritrócitos Normocromáticos

OMS- Organização Mundial de Saúde

PCE- Eritrócitos Policromáticos

SBF- Soro Bovino Fetal

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	<b>13</b>
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>15</b>
<b>2.1 Plantas medicinais</b> .....	<b>15</b>
<b>2.2 Compostos derivados do metabolismo das plantas</b> .....	<b>16</b>
<b>2.3 Constituintes fitoquímicos e suas ações antioxidantes e quimiopreventivas</b> .....	<b>17</b>
<b>2.4 Toxicidade e Mutagênese de plantas medicinais e de seus derivados</b> .....	<b>19</b>
<b>2.5 <i>Ximenia americana</i> L.</b> .....	<b>20</b>
2.5.1 <i>Constituintes fitoquímicos de X. americana</i> L. ....	21
2.5.2 <i>Uso na medicina popular e comprovações científicas da ação de X. americana</i> L. ....	22
<b>2.6 Câncer</b> .....	<b>22</b>
2.6.1 <i>Câncer de cólon</i> .....	25
2.6.2 <i>Indução da carcinogênese colorretal (CCR)</i> .....	27
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>30</b>
<b>3.1 Objetivo geral</b> .....	<b>30</b>
<b>3.2 Objetivos específicos</b> .....	<b>30</b>
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>31</b>
<b>4.1 Material</b> .....	<b>31</b>
4.1.1 <i>Material Botânico</i> .....	31
4.1.1.1 <i>Obtenção do Material Botânico</i> .....	31
4.1.1.2 <i>Obtenção do Extrato nebulizado de casca de Ximenia americana</i> L.....	31
4.1.2 <i>Agentes Químicos</i> .....	31
4.1.3 <i>Animais Experimentais</i> .....	31
<b>4.2 Métodos</b> .....	<b>32</b>
4.2.1 <i>Administração do extrato nebulizado de cascas de X. americana</i> L. ....	32
4.2.2 <i>Administração da DMH (1,2-dimetilhidrazina)</i> .....	32
4.2.3 <i>Administração do EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético)</i> .....	32
4.2.4 <i>Coleta de sangue para contagem diferencial de leucócitos (CD)</i> .....	32
4.2.5 <i>Eutanásia dos animais e coleta do material biológico</i> .....	33
4.2.6 <i>Bioensaios</i> .....	33
4.2.6.1 <i>Ensaio de micronúcleo em medula óssea (MN)</i> .....	33
4.2.6.1.1 <i>Ensaio de citotoxicidade</i> .....	33
4.2.6.1.2 <i>Ensaio de mutagenicidade</i> .....	34
4.2.6.2 <i>Ensaio de Focos de Criptas Aberrantes (FCA)</i> .....	34
4.2.6.3 <i>Redução de danos de FCA</i> .....	34
4.2.6.4 <i>Ensaio de contagem diferencial de leucócitos (CD)</i> .....	35
4.2.7 <i>Delineamentos experimentais</i> .....	35
4.2.7.1 <i>Avaliação de toxicidade oral aguda, citotoxicidade e mutagenicidade do extrato nebulizado de cascas de X. americana</i> L. em camundongos <i>Mus musculus</i> .....	35
4.2.7.2 <i>Avaliação toxicidade oral subaguda, citotoxicidade e mutagenicidade do extrato nebulizado de cascas de X. americana</i> L. em camundongos <i>Mus musculus</i> .....	36
4.2.7.3 <i>Avaliação da toxicidade oral crônica, citotoxicidade e mutagenicidade do extrato nebulizado de cascas de X. americana</i> L. em medula óssea e da carcinogenicidade em cólon de camundongos <i>Mus musculus</i> .....	36
4.2.7.4 <i>Avaliação da atividade anticarcinogênica de cólon do extrato nebulizado de cascas de X. americana</i> L.em camundongos <i>Mus musculus</i> .....	38
4.2.7.4.1 <i>Grupos Controles</i> .....	38
4.2.7.4.1.1 <i>Tratamento Controle Negativo (CN)</i> .....	38

4.2.7.4.1.2. Tratamento Controle Positivo (CP) .....	38
4.2.7.4.2 Grupos de tratamento com o extrato nebulizado de cascas de <i>X. americana</i> L. .....	39
4.2.7.4.2.1 Pré- Tratamento .....	39
4.2.7.4.2.2 Tratamento Simultâneo .....	39
4.2.7.4.2.3 Pós-tratamento .....	39
4.2.7.4.2.4 Tratamento Contínuo .....	39
4.2.8 Análises estatísticas .....	40
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>41</b>
<b>ARTIGO 1:</b> Avaliação da toxicidade aguda e subaguda, citotoxicidade e mutagenicidade do extrato nebulizado de cascas de <i>Ximenia americana</i> L. para camundongos <i>Mus musculus</i> ...	42
<b>ARTIGO 2:</b> Avaliação da toxicidade crônica, citotoxicidade, mutagenicidade e carcinogenicidade do extrato nebulizado de cascas de <i>Ximenia americana</i> L. em camundongos <i>Mus musculus</i> .....	64
<b>ARTIGO 3:</b> Efeito quimiopreventivo do extrato nebulizado de cascas de <i>X. americana</i> L., para carcinogênese colorretal, induzida pela 1,2-dimetilhidrazina, em camundongos <i>Mus musculus</i> .....	81
<b>6. CONCLUSÕES GERAIS.....</b>	<b>103</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>105</b>

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil tem uma das floras mais ricas do mundo, comportando cerca de 19 % da flora mundial (GIULIETTI et al., 2005), sendo um potencial provedor de espécies medicinais. O cerrado é um importante ecossistema brasileiro que abriga 30 % da diversidade vegetal do país (PAGOTTO et al., 2006) e ocupa cerca de 23 % do território brasileiro. Na Caatinga do Nordeste brasileiro, especialmente na região semiárida, as plantas são amplamente utilizadas na medicina popular, tendo papel significativo para tratamento de doenças em áreas rurais e urbanas (SANTOS, 2009). Porém, o uso baseado apenas em conhecimento empírico, não é suficiente para validar uma planta medicinal como medicamento seguro e eficaz.

Os extratos vegetais podem provocar efeitos colaterais graves nos seres humanos e, por esta razão, possuem contraindicações, quanto ao seu uso. Assim, antes que um extrato vegetal seja administrado como medicamento, ele necessita passar por certificações que comprovem a sua qualidade e segurança e também por padronização de seu uso (MAGALHÃES, 2015). O desconhecimento sobre os possíveis efeitos adversos dos extratos vegetais, pode proporcionar sérias consequências à saúde humana em curto e em longo prazo (NAVARRO-MOL, 2000).

A espécie *Ximenia americana* L., conhecida popularmente no Brasil como ameixa-do-mato, ameixa-brava ou ameixa-do-sertão (SILVA et al., 2008), pertence a família Olacaceae (BRASILEIRO et al., 2008). As cascas do caule desta planta vêm sendo usadas na medicina popular, contra esquistossomose, febres, diarreias e dores de dente (BURKILL, 1997); micoses (BURKILL, 1997; MORAIS et al., 2005); ulcerações lepróticas (OGUNLEYE e IBITOYE, 2003); ferimentos e falta de ar (FRANCO e BARROS 2006); gastrite, infecção de garganta, corrimento vaginal (ALVES et al., 2007); inflamação e prisão de ventre (ROQUE et al., 2010); inflamação do útero e ovários, cicatrizante, limpeza do útero, limpeza do sangue, aborto, anemia, úlcera estomacal, câncer, infecção urinária, coceira, feridas, queimaduras (OLIVEIRA et al., 2010). Diferentes formulações e diferentes partes da *X. americana*, como casca do caule, as raízes, folhas e fruto, têm também sido reportada na literatura como de ação antimalárica (BENOIT et al., 1996; TRAORÉ et al., 2015; SULEMAN et al., 2018); antiviral para o vírus HIV (ASRES et al., 2001); anticonvulsivante (QUINTANS et al., 2002); antimicrobiana (OGUNLEYE e IBITOYE, 2003; OMER e ELNIMA, 2003; MORAIS-COSTA et al., 2015); antibacteriana (KONÉ et al., 2004); anticancerígena (VOSS et al., 2006; PERVAIZ et al., 2015; KABRAN et al., 2017); antioxidante (LAMIEN-MEDA et al., 2008; MAIKAI et al., 2010; ALMEIDA et al., 2016);

analgésica (SIDDAIAH et al., 2009; HEMAMALINI et al., 2011); antipirética (SORO et al., 2009); HEMAMALINI et al., 2011; KONATE et al., 2018; SILVA et al., 2018); antiparasitária (MAIKAI, 2011); anti-inflamatória (OLABISSI et al., 2011; SHETTAR et al., 2015; SILVA-LEITE et al., 2018); antidiabética (SHETTAR et al. 2017); gastroprotetora (ARAGÃO et al., 2018; PANTOJA et al., 2018) e antiedematogênica (OGUNLEYE e IBITOYE, 2003; FERNANDES et al., 2017).

Análise fitoquímica do extrato da casca do caule de *X. americana* mostrou que este material apresenta polifenóis, taninos e flavonoides, tais como, ácido gálico, catequina e quercetina (SANTANA et al., 2018), altos teores de glicosídeos cardiotônicos, taninos, alcaloides, antraquinonas, flavonoides, saponinas e terpenoides (MAIKAI et al., 2010; JAMES et al. 2007) e carboidratos (JAMES et al. 2007). Estes compostos são reportados na literatura como de ação quimiopreventiva contra o câncer e doenças cardíacas (BASKARAN et al., 2016), para diabetes e Alzheimer (KRISHNAIAH et al., 2011; KOLNIAK-OSTEK e OSZMIANSKI, 2015).

Considerando os efeitos descritos na literatura e os componentes químicos da *X. americana* L., o presente trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos do seu extrato nebulizado em camundongos *Mus musculus*, linhagem Swiss. Neste estudo, foram realizados ensaios de: toxicidade aguda, subaguda e crônica; potencial citotóxico e mutagênico, sobre células da medula óssea, por meio do ensaio do micronúcleo; resposta imunológica em leucócitos circulantes, pelo ensaio de contagem diferencial de leucócitos; efeitos carcinogênicos e anticarcinogênicos em tecido colorretal, após indução por 1,2-dimetilhidrazina (DMH).

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Plantas medicinais

A prática do uso de produtos derivados de plantas e o conhecimento acerca desta aplicação para fins terapêuticos vêm sendo passado de geração a geração. Assim, as comunidades humanas têm utilizado, por milênios, muitas plantas medicinais como estratégia para tratar ou prevenir doenças (QUINTANS et al., 2002; CORRÊA e ALVES, 2008).

A OMS define planta medicinal como todo e qualquer vegetal que possui, em um ou mais de seus órgãos, substâncias que possam ser utilizadas para fins terapêuticos. Para esta organização, cerca de 80 % da população mundial utiliza, de algum modo, plantas medicinais como medicamentos. Muito embora o Brasil possua a maior diversidade vegetal do mundo, com cerca de 60.000 espécies de vegetais superiores catalogadas, desse total, apenas 8 % foram estudadas para pesquisas de compostos bioativos e 1.100 espécies foram avaliadas em suas propriedades medicinais (GUERRA et al., 2001; GADELHA et al., 2013).

As plantas medicinais são utilizadas com a finalidade de auxiliar ou substituir as terapias convencionais no tratamento de diversas doenças. Os vegetais utilizados na medicina popular brasileira têm a sua manipulação realizada de forma artesanal e empírica, sem estudo científico adequado. As práticas populares comuns de consumo de plantas medicinais, principalmente nas pequenas cidades do Norte e do Nordeste brasileiros, se dão por meio de preparos de unguentos, de chás e infusões, consumidos via oral ou usados em inalações e em banhos de assento, (VENÂNCIO, 2006).

As plantas usadas na medicina popular devem ainda ser avaliadas, quanto ao risco/benefício do uso, por meio de estudos farmacodinâmicos e toxicológicos (FARIAS, 2007). Apesar do avanço atual das pesquisas nas áreas da farmacologia, o consumo de substâncias derivadas de plantas deve ser monitorado, quanto aos efeitos tóxicos dessas substâncias, no sentido de alertar a população sobre os seus possíveis riscos à saúde (BAGATINI et al. 2007). De acordo com Simões et al. (2004), o consumo de plantas medicinais requer atenção, pois várias plantas brasileiras ainda não foram suficientemente estudadas, no que se refere ao seu potencial toxicológico e ou mutagênico.

Muitos fármacos modernos são desenvolvidos a partir de produtos naturais. Estima-se que, aproximadamente 40% dos medicamentos disponíveis hoje no mercado farmacêutico, foram desenvolvidos, direta ou indiretamente, a partir de fontes naturais e destes, 25% são provenientes de plantas medicinais (CALIXTO, 2001). O mercado da terapia à base de



plantas medicinais movimentada em nosso país cerca de R\$ 500 milhões, enquanto que na Europa e EUA, o movimento em 2000, foi de 8,5 e 6,3 bilhões respectivamente (SCHENKEL e SIMÕES 2003).

Os efeitos colaterais das drogas químicas sintéticas são uma preocupação crescente da sociedade (LEE et al., 2015), o que tem levado a um interesse crescente pelos produtos naturais (SHIN et al., 2013). Devido a essa procura, os produtos naturais têm sido alvo de inúmeros estudos para obtenção de moléculas ativas com potenciais terapêuticos (TRAESEL et al., 2014). Entretanto, para que esses produtos tenham uso medicinal, eles devem ser submetidos a estudos químicos e de toxicidade, que avaliem a sua segurança e eficácia (REYES-GARCIA, 2010; MELO et al., 2011).

O consumo de chás e infusões também deve ser monitorado, visando alertar os consumidores sobre os efeitos ou danos indesejáveis que esses produtos possam promover à saúde, pois, como as pessoas estão frequentemente expostas a certas substâncias com potenciais mutagênico e ou genotóxico, o que poderá desencadear danos adicionais aos seus usuários. Embora algumas substâncias naturais isoladas possam servir como base para a produção de novos fármacos, o produto final deve ser rigorosamente estudado, com relação às suas propriedades bioativas e tóxicas, para que se possa ter um uso racional de produtos derivados da flora (FABRI, 2012).

As plantas medicinais são consideradas agentes xenobiontes que podem sofrer biotransformação e, eventualmente, serem tóxicas para o usuário, efeitos esses que podem ou não se manifestarem de imediato ou permanecerem de forma assintomática por um longo período, dificultando assim a associação do sintoma com a ingestão do produto natural (LAPA et al. 2004).

## **2.2 Compostos derivados do metabolismo das plantas**

As substâncias essenciais à vida de uma planta são produzidas pelo seu metabolismo primário, que sintetiza vários compostos (carboidratos, proteínas, lipídeos, aminoácidos, vitaminas e ácidos nucleicos) necessários para a realização de todas as suas funções vitais (YEOH et al., 1979; SANTOS, 1996; CHAMPEET al., 2008). Além do metabolismo primário, as plantas também apresentam o chamado metabolismo secundário, cujos metabólitos, diferentemente dos metabólitos primários, apresentam, de maneira geral, estruturas complexas, de baixo peso molecular e em baixas concentrações, mas com grande atividade biológica (BERG e LUBERT, 2008; CHAMPEET et al., 2008; PEREIRA e CARDOSO, 2012). Os produtos do metabolismo secundário conferem vantagens adaptativas

à planta (FUMEGALLI et al., 2008) e, conseqüentemente, à uma maior chance de sobrevivência desses organismos (SANTOS, 1999). Os compostos do metabolismo secundário são essenciais para as interações planta/ecossistema, pois estão relacionados, principalmente, com a proteção e defesa do organismo e com a atração de polinizadores e dispersores de suas sementes (SANT'ANA et al., 2002; SIMÕES et al., 2004). Assim, pelas características químicas dos compostos secundários, eles despertam muito interesse não só pelas atividades biológicas exercidas pelas plantas em resposta aos estímulos do meio ambiente, mas também pela imensa atividade farmacológica que possuem (PEREIRA e CARDOSO, 2012).

### **2.3 Constituintes fitoquímicos e suas ações antioxidantes e quimiopreventivas**

Dentre os constituintes fitoquímicos estão os polifenóis, compostos derivados do metabolismo secundário, importantes na pigmentação, no crescimento e reprodução das plantas, assim como na resistência contra patógenos (GHASEMZADEH e GHASEMZADEH, 2011). Os compostos polifenólicos podem ser subdivididos em dois grupos, os flavonoides e os não flavonoides. Dentre os não flavonoides, está o ácido gálico, composto com reconhecida ação protetora contra o câncer e doenças cardíacas, que, por esta razão, tem recebido uma atenção especial na área da farmacologia (PEREIRA e CARDOSO, 2012; BASKARAN et al., 2016).

Os flavonoides são conhecidos como os principais antioxidantes presentes em frutas. São fitoquímicos com elevado potencial redox, o que permite que atuem como agentes antioxidativos (IGNAT et al., 2011; KAMILOGLU et al., 2016). Os flavonoides são classificados em flavonas (apigenina, luteolina), flavonóis (quercetina, miricetina), catequinas ou flavonols (epicatequina, galocatequina), flavanonas (naringenina, hesperitina), diidroflavonóis, isoflavonas (genisteína, daidzeína), chalconas, auronas, antocianinas e antocianidinas (cianidina, pelargonidina).

As antocianinas caracterizam um grupo de pigmentos vegetais hidrossolúveis, amplamente distribuídos no reino vegetal. Seu espectro de cor vai do vermelho ao azul, apresentando-se também como uma mistura de ambas as cores, resultando em tons de púrpura. Muitas frutas, hortaliças, folhas e flores devem sua atrativa coloração a estes pigmentos, que se encontram dispersos nos vacúolos celulares (DEGÁSPARI e WASZCZYNSKYJ, 2004). Este grupo químico pode ser definido como glicosídeos de antocianidinas considerados excelentes antioxidantes, porque doam hidrogênio aos radicais

livres altamente reativos, prevenindo a formação de novos radicais (CHITARRA e CHITARRA, 2005).

Ainda dentre os polifenóis, temos: o grupo dos taninos, que podem ser subdivididos em duas classes distintas, denominadas de taninos hidrolisáveis, que tem caráter adstringente, e taninos condensados (OSÓRIO et al., 2012); as lignanas, cuja estrutura química é mais complexas, estando, geralmente, presentes nas sementes (LANDETE, 2012)

O consumo desses compostos na alimentação humana está relacionado com a ação antioxidante e anti-inflamatória, devido a sua capacidade de transferência de elétrons e ou átomos de hidrogênio aos radicais livres, bem como a capacidade de se ligar a íons metálicos potencialmente pró-oxidante (CRAFT et al., 2012). Eles também estão associados a uma redução do risco de câncer, doenças cardiovasculares, dermatite atópica, diabetes e doença de Alzheimer (KRISHNAIAH et al., 2011; KOLNIAK-OSTEK et al., 2015). Diversos estudos têm demonstrado que o consumo diário de substâncias antioxidantes pode produzir uma ação protetora eficaz contra os processos oxidativos, que naturalmente ocorrem no organismo (DEGÁSPARI e WASZCZYNSKYJ, 2004).

Os polifenóis, de maneira geral, atuam como antioxidantes, por meio do sequestro de diversas espécies reativas, por agirem como agente redutor e quelando metais, como o ferro e o cobre, prevenindo, assim a produção de agentes oxidantes (HALLIWELL, 2007). Além disso, os polifenóis podem modular, de forma direta ou indireta, a expressão de genes envolvidos na síntese de enzimas dos sistemas antioxidantes (JOVEN et al., 2014). Os efeitos dos polifenóis sobre células cancerosas podem ser ainda mais complexos, pois esses compostos podem exercer efeitos quimiopreventivos, que parecem estar associados às suas propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes (WANG et al., 2014). Lee et al. (2009) afirmam também que os polifenóis podem bloquear a formação do tumor, por diminuir os níveis de espécies reativas de oxigênio no organismo. Essa ação protegerá as células de danos oxidativos, inibirá a proliferação, metástase, inflamação e fatores de transcrição que podem auxiliar na formação do tumor, por serem capazes de modular diversas vias de transdução de sinais (LEE et al., 2009).

A quimioprevenção e a utilização de compostos químicos naturais ou sintéticos que possam prevenir, bloquear ou reverter os processos carcinogênicos, por inibição de etapas de iniciação da carcinogênese ou de progressão da malignidade (WU e HAWK, 2011). Muitos estudos tem investigado a ação dos antioxidantes como compostos quimiopreventivos, pois eles podem interagir com os radicais livres, impedindo que as moléculas vitais sejam danificadas e melhorando o sistema de reparo (OSMAK et al., 1997; PEREIRA, 2016) ou

ainda interagindo diretamente com o composto mutagênico, impedindo sua interação com o DNA (FERGUSON et al., 2004; RESENDE, 2011).

As ações quimiopreventivas dos fitoquímicos são bastante diversas (SURH, 2003) e a literatura mostra que os fitoquímicos são capazes de modular marcadores envolvidos no desenvolvimento do câncer de cólon, como as enzimas COX-2 e focos de criptas aberrantes. O consumo de alimentos ricos em fitoquímicos foi capaz de reduzir a expressão da enzima COX-2 em células de intestino de ratos (RODRIGUEZ-RAMIRO et al., 2013; PANDURANGAN et al., 2014; TAN et al., 2014; CAMPOS, 2017). Foram descritos diversos estudos que investigaram a ação de fitoquímicos na prevenção do desenvolvimento de focos de criptas aberrantes (FCA), como a ação da romã (BANERJEE et al., 2013), do extrato de vinho tinto (MAZUE et al., 2014), do chá verde (XIAO, 2008) e de suco de maçã (BARTH et al., 2005). Os efeitos observados nestes estudos podem ser explicados pelas descrições de Clifford e Knight (2004), que sugerem uma proteção conferida pelos polifenóis, quando esses passam pelo colón intestinal, afirmação esta complementada por outros estudos (BLAUT, 2003; JENNER, 2005; SAMPAIO, 2014), que citam que quando os polifenóis entram no cólon, eles sofrem metabolização pela ação das enzimas da microbiota intestinal.

#### **2.4 Toxicidade e Mutagênese de plantas medicinais e de seus derivados**

Segundo a ANVISA (2010), toda substância derivada de plantas que precede a síntese de compostos químicos com fins terapêuticos são consideradas medicinais. Porém, existem relatos de que extratos de plantas podem causar efeitos deletérios sobre sistemas biológicos, contrariando a crença popular de que o que é natural não faz mal à saúde (FIGUEIREDO, 2012).

A toxicidade não é uma medida direta de carcinogenicidade, mas é frequentemente usada como um indicador para o câncer, uma vez que os testes de mutagenicidade medem um evento inicial ou intermediário da tumorigênese (FEARON e VOGELSTEIN, 1990), pois se por ventura, houver a fixação desses erros no DNA, a célula normal pode se tornar uma célula tumoral em consequência destes erros fixados tornando-se cumulativos (FIGUEIREDO, 2012). Os agentes mutagênicos, ao alterar o ciclo celular, podem induzir a formação de tumores, criando as condições para que a célula se reproduza descontroladamente, podendo invadir outros tecidos (ALMEIDA NETO et al. 2005). Esta relação entre mutações e neoplasias é bem documentada, sendo que compostos químicos reconhecidamente cancerígenos são, em sua maioria, positivos quando testados em ensaios que medem mutagenicidade (MARON e AMES, 1983; AMES e GOLD, 2000). Segundo De Flora (1996;

1998), há também evidências do papel das mutações na patogenia de doenças crônico-degenerativas, principais causas de mortalidade na população humana. Quando tais mutações ocorrem nas células germinativas, elas podem originar alterações genéticas transmissíveis, levando a desordens genéticas, fertilidade reduzida, síndromes fetais, malformações e até abortos (RABELLO-GAY, 1991). Sendo assim as mutações podem promover várias doenças entre elas o câncer, que por sua vez, podem ser induzidas pelas alterações no DNA em resposta à exposição a vários fatores como substâncias contidas em constituintes fitoquímicos.

Lapa et al. (2004) observaram que as misturas complexas presentes nas plantas medicinais podem causar danos genéticos ao seu consumidor, danos estes que, de acordo com os autores, podem ser assintomáticos por longos períodos de tempo, mas também podem ocasionar efeitos nefrotóxicos, neurotóxicos, hepatotóxicos ou até mesmo, carcinogênicos. Assim, existe a necessidade de se monitorar, por meio de ensaios toxicológicos, os possíveis efeitos deletérios de chás, infusões ou soluções extrativas usados com fins medicinais, para que os usuários possam ser alertados sobre as consequências que estes tipos de compostos possam promover na saúde humana (VICENTINI et al., 2001).

Os ensaios mutagênicos permitem avaliar processos que induzem danos no DNA, tanto por ação de agentes físicos, como químicos e biológicos. Os agentes mutagênicos podem interagir, direta ou indiretamente, com o DNA ou com proteínas envolvidas na integridade do genoma (KIRSCH-VOLDERS et al., 2003). Todos os seres vivos são passíveis de mutações, sendo um dos processos fundamentais para a evolução e a diversidade das espécies. As mutações podem surgir espontaneamente ou serem induzidas pela exposição aos agentes conhecidos como mutagênicos (GRIFFITHS et al. 2001). Porém, algumas mutações não implicam em mudanças detectáveis no organismo ou na atividade metabólica das células. Outras afetam um número pequeno de regiões do genoma, quando ocorrem em genes específicos, podem determinar vantagens ou mediar um crescimento excessivo das células de um determinado tecido se o erro não for corrigido (RIBEIRO e MARQUES, 2003).

### **2.5 *Ximenia americana* L.**

A espécie *X. americana* L., pertencente a família Olacaceae, é um arbusto, de 3 a 4 m de altura, com ramos armados de espinhos, caule de casca lisa e de coloração vináceo-avermelhada, principalmente nos ramos mais jovens. Suas flores são pequenas e alvas, seus frutos são do tipo drupa, subglobosos, de casca amarela alaranjado, medindo de 1,5 a 2 cm de diâmetro, envolvendo uma única semente com amêndoa branca e sua polpa é esbranquiçada e doce (EROMOSELE e EROMOSELE, 2002; LORENZI e MATOS, 2002; MATOS, 2007;

BRASILEIRO et al., 2008; SOUZA NETO JÚNIOR, 2016). No Brasil, sua ocorrência se estende desde o Pará até a Bahia, em Minas Gerais, Goiás e Mato Grosso, inclusive nos tabuleiros litorâneos do Nordeste (MAIA, 2004; SACANDE e VAUTIER, 2006; REZANKA e SIGLER, 2007; SARMENTO, 2015). Essa espécie é popularmente conhecida no Brasil como ameixa-do-mato, ameixa-brava ou ameixa-do-sertão (SILVA et al., 2008).

### 2.5.1 *Constituintes fitoquímicos de X. americana L.*

A análise fitoquímica de extratos da casca do caule de *X. americana*. revelou a presença de polifenóis, taninos e flavonoides, tais como, ácido gálico, catequina e quercetina (SANTANA et al., 2018). Também foram encontrados nesse material altos teores de glicosídeos cardiotônicos, taninos, alcaloides, antraquinonas, flavonoides, saponinas, terpenoides (JAMES et al., 2007; MAIKAI et al., 2010) e carboidratos (JAMES et al., 2007). Análises semelhantes realizadas com as sementes de seu fruto mostraram um teor de 70 % de óleo fixo viscoso, de cor amarela, derivado de ácidos graxos que é muito utilizado na culinária (BRASILEIRO et al., 2008) e como purgativo. No entanto, seu principal uso é como emoliente, óleo capilar, condicionador e hidratante para a pele, na fabricação de sabonetes e como componente de batons e lubrificantes (REZANKA e SIGLER, 2007). Eromosele e Eromosele (2002) identificaram 10 ácidos graxos presentes no óleo extraídos das sementes desta planta, dos quais 7 deles são do tipo insaturado. Esses estudos detectaram que o óleo contém ácidos graxos essenciais como o linoléico (1,34%), o linolínico (10,31%) e o araquidônico (0,6%), o que denota um considerável valor nutricional a este produto.

Mevy et al., (2006) estudaram, em GC-MS, o óleo volátil das folhas de *X. americana*L. Os autores identificaram 33 componentes, que correspondem a 98 % do total do óleo. O óleo estudado apresentou, 69 % de compostos aromáticos, 12,5 % de compostos lipídicos e 13 % de terpenos. O constituinte encontrado em maior quantidade foi o benzaldeído (63,5 %), seguido pelo cianeto de benzila (13 %) e isoforona (3,5 %), sendo este último composto já relatado como carcinogênico. Ogunleye e Ibitoye (2003) detectaram, em extratos das folhas da *X. americana*L., a presença de flavonóides e taninos, e a ausência de alcalóides. Freiburger et al. (1998) estimam ainda que 50 g/dia dessa planta satisfaz as necessidades diárias de cálcio de um jovem adulto de até 24 anos, e ainda tem grande quantidade de magnésio (14 mg/g) e pequena quantidade de ferro (107 µg/g), manganês (39,4 - 49,8 µg/g) e proteínas (7,87%).

### 2.5.2 *Uso na medicina popular e comprovações científicas da ação de X. americana L.*

Na medicina popular e na literatura científica, a espécie *X. americana* L. tem sido referida como uma planta com potencial medicinal. Diferentes formulações e diversas partes desta planta (casca do caule, raízes, folhas e frutos) vêm sendo usadas como: antimalárica (BENOIT et al., 1996; TRAORÉ et al., 2015; SULEMAN et al., 2018); antiviral para HIV (ASRES et al., 2001); anticonvulsivante (QUINTANS et al., 2002); antimicrobiana (OGUNLEYE e IBITOYE, 2003; OMER e ELNIMA, 2003; MORAIS-COSTA et al., 2015); antibacteriana (KONÉ et al., 2004); antimicótica (BURKILL, 1997; MORAIS et al., 2005); anticancerígena (VOSS et al., 2006; PERVAIZ et al., 2015; KABRAN et al., 2017); antioxidante (LAMIEN-MEDA et al., 2008; MAIKAI et al., 2010; ALMEIDA et al., 2016); analgésica (SIDDAIAH et al., 2009); antipirética (BURKILL, 1997; SORO et al., 2009); HEMAMALINI et al., 2011; KONATE et al., 2018; SILVA et al., 2018); antiparasitária (MAIKAI, 2011) e em tratamentos da esquistossomose (BURKILL, 1997); anti-inflamatória (BURKILL, 1997; ALVES et al., 2007; OLABISSI et al., 2011; SHETTAR et al., 2015; SILVA-LEITE et al., 2018); antidiabética (BURKILL, 1997; SHETTAR et al., 2017); gastroprotetora (ALVES et al., 2007; ARAGÃO et al., 2018; PANTOJA et al., 2018); anti-edematogênica (SILVA et al., 2018); para tratamentos de ulcerações lepróticas e doenças de pele (OGUNLEYE e IBITOYE, 2003; SATOTO, 2017; VIEIRA, 2018); cicatrizante (OLIVEIRA et al., 2010) e em tratamentos de erupções de Sarampo, de queimaduras e de picadas de animais peçonhentos (SATOTO, 2017; VIEIRA, 2018).

## 2.6 Câncer

O câncer é o nome genérico dado a um conjunto de doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células e um potencial invasivo para tecidos e órgãos. O processo carcinogênico (formação de câncer) é subdividido em três estágios:

- Estágio de iniciação. Neste estágio, as células sofrem alterações irreversíveis em seu genoma, devido a danos no DNA, nos cromossomos ou ainda no epigenoma celular. Os iniciadores podem ser substâncias químicas endógenas, como os radicais livres, ou exógenas, como os xenobióticos. Alterações que levam à ativação de proto-oncogenes ou à inativação de genes supressores de tumor podem ser classificadas como eventos

- iniciadores de tumor (YUSPA e POIRIER, 1988; WEITZMAN e GORDON, 1990; JONES e BAYLIN, 2002; HALLIWELL, 2007; CAMPOS, 2017).
- Na promoção do tumor, os danos genômicos sofridos pelas células podem resultar em alterações na expressão de genes que regulam a diferenciação e o crescimento celular. Nesta fase, as células já inicializadas sofrem expansão clonal seletiva, proliferação celular e ou inibição da apoptose, podendo resultar na formação de um tumor benigno. Este estágio é normalmente reversível, pois a promoção do tumor é mediada por agentes promotores que, se deixarem de existir, permitem a regressão das lesões. Os xenobióticos e substâncias endógenas, como os radicais livres e proteínas inflamatórias, podem atuar como agentes promotores (CAIRNS, 1975; VERMA e BOUTWELL, 1980; YUSPA e POIRIER, 1988; WEITZMAN e GORDON, 1990; JONES e BAYLIN, 2002; POLLOCK, 2006; HALLIWELL, 2007; CAMPOS, 2017).
  - Na progressão ocorrem mudanças adicionais no genoma que induzem a transformação de lesões pré-malignas em lesões malignas que normalmente vêm acompanhadas de rápido crescimento, invasão, metástase e instabilidade genética (WEITZMAN e GORDON, 1990; POLLOCK, 2006; HALLIWELL, 2007; CAMPOS, 2017). Durante o desenvolvimento do câncer, a célula tumoral adquire importantes características, que vão permitir que a célula sobreviva, prolifere e dissemine (HANAHAN e WEINBERG, 2000; CAMPOS, 2017).

A transição de uma célula normal para uma neoplásica acontece por uma série de alterações genéticas e epigenéticas em genes supressores de tumor e proto-oncogenes (FEMIA et al., 2008). Os genes supressores de tumor são genes que, ao serem inativados, aumentam a chance de crescimento tumoral, pois normalmente eles atuam reparando danos no DNA, desacelerando o ciclo celular ou controlando a apoptose. A inibição total ou parcial desses genes pode resultar em um tumor.

Os proto-oncogenes são genes presentes nas células normais que costumam agir no ciclo celular. Assim, a expressão aumentada de algum desses genes, por uma mutação, por exemplo, resulta em um crescimento celular descontrolado, que também, desencadeia o aparecimento de um tumor. Quando um proto-oncogene deixa de funcionar e a sua expressão é alterada, ele passa a ser chamado de oncogene (COOPER, 2000; WEINBERG, 2014).

Em 2011, Hanahan e Weinberg publicaram um estudo sugerindo duas características adquiridas pelas células tumorais: reprogramação do metabolismo energético e escape do sistema imunológico. A ativação do processo inflamatório é uma resposta do organismo a



alguma situação de injúria celular. Se essa injúria for logo sanada pelo sistema imunológico, isso é, em curto período de tempo, não haverá comprometimento para a célula afetada. Contudo, se a resposta inflamatória se torna crônica, ela pode causar diversas doenças (VENDRAMINI-COSTA e CARVALHO, 2012), dentre elas o câncer. Isso acontece porque a inflamação crônica induz uma série de alterações nos tecidos como o remodelamento e perda da arquitetura normal do tecido e danos nas biomoléculas, via estresse oxidativo (DE VISSER et al., 2006). No câncer, a inflamação também pode induzir proliferação, crescimento e angiogênese tumoral, invasão do tecido e metástase (MANTOVANI et al., 2008; MURDOCH et al., 2008; EGEBLAD et al., 2010; QIAN e POLLARD, 2010; CAMPOS, 2017).

A importância da inflamação nos três estágios do desenvolvimento de câncer (iniciação, promoção e progressão) é amplamente descrita na literatura (GRIVENNIKOV et al., 2010; GRIVENNIKOV e KARIN, 2010). Em alguns casos, como no câncer de cólon associado a processos inflamatórios (colite), a inflamação também pode atuar como um agente iniciador, induzindo tanto alterações epigenéticas como no DNA (GRIVENNIKOV e KARIN, 2010).

A ideia de que o sistema imunológico desempenharia um papel antitumoral teve sua popularidade aumentada e diminuída ao longo do século passado (FISHER et al., 2014). Isso porque, apesar dos efeitos pró-tumorais, a inflamação também pode ativar células do sistema imunológico, favorecendo o reconhecimento e a eliminação de células cancerígenas em um processo denominado de “vigilância imunológica contra tumores” (SMYTH et al., 2006). O conceito de que células do sistema imunológico podem reprimir o crescimento tumoral, foi proposto por Ehrlich (1909). Muitos anos depois, Burnet et al. (1970) demonstraram que camundongos apresentavam antígenos tumorais, criando assim o conceito de vigilância imunológica. Essa teoria propõe que é função do sistema imunológico reconhecer e destruir células transformadas. Com o passar dos anos e a melhora de recursos tecnológicos na pesquisa, essa ideia foi aprimorada e expandida, sendo, atualmente, reconhecido que tanto a imunidade inata quanto a adquirida participam da vigilância imunológica (SMYTH et al., 2006).

A enzima ciclo-oxigenase-2 (COX -2) é pouco expressa em tecidos normais. Entretanto a expressão de seu gene é fortemente ativada por estímulos pró-inflamatórios, logo no início do processo inflamatório (LASA et al., 2000). Essa enzima catalisa a reação de conversão do ácido araquidônico em prostaglandina que, por sua vez, serve de substrato para a formação de diversas prostaglandinas e tromboxanos (LINKOUS e YAZLOVITSKAYA, 2010). A regulação da expressão da COX-2 acontece em nível transcricional e pós-

transcricional (LASA et al., 2000). As prostaglandinas são capazes de modular a expressão desta enzima, alterando a estabilidade de seu mRNA e ativando a região promotora do seu gene (SALES et al., 2008). Além disso, sua expressão é aumentada por ação de fatores de crescimento, citocinas, hipóxia, oncoproteínas e promotores de tumor (GREENHOUGH et al., 2009; KHAN et al., 2011). Diversos estudos vêm apontando um aumento da expressão da COX-2 em células cancerígenas (SINICROPE e GILL, 2004; GREENHOUGH et al., 2009; WARREN et al., 2009), principalmente em câncer de cólon, onde a sua expressão aparece aumentada em 85 % dos carcinomas colorretais em humanos (EBERHART et al., 1994). Esse aumento exerce um papel fundamental no desenvolvimento do tumor e está associado a um pior prognóstico e uma menor sobrevida destes pacientes (DE GROOT et al., 2007). Concomitantemente, a literatura mostra que a inibição da COX-2 em ratos submetidos à aplicação de azoximetano (droga que induz câncer de cólon) resulta em prevenção do desenvolvimento de câncer de cólon (OSHIMA et al., 1996; KAWAMORI et al., 1998). Além disso, estudos mostram uma menor incidência de câncer de cólon em indivíduos que fazem uso de anti-inflamatórios não esteroidais, já que estas drogas inibem a COX-2 (KELLOFF et al., 1999).

### **2.6.1 Câncer de cólon**

O câncer de cólon é o terceiro diagnóstico mais comum em homens e o segundo em mulheres. A cada ano são registrados, mundialmente, 1,3 milhões de novos casos e mais de 650.000 mortes (TORRE et al., 2015; PEREIRA, 2016). No Brasil, segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA) (2014), em 2013 foram registradas 13.961 mortes relacionadas com os cânceres de cólon e reto, e em 2016 foram estimados 34.280 novos casos, sendo 16.660 em homens e 17.620 em mulheres (INCA, 2016).

O desenvolvimento do câncer de cólon engloba diferentes fatores de riscos: predisposição genética, inflamação intestinal crônica, mutagênicos ambientais, patógenos intestinais (TERZIC et al., 2010) e alimentação (TETE et al., 2012). Os cânceres de cólon causados por predisposições genéticas representam uma baixa porcentagem (20 %) da ocorrência desta doença (RUSTGI, 2007), enquanto que os fatores ambientais são os seus maiores responsáveis (TERZIC et al., 2010). Estudos de Yang et al., 2016 mostraram que os fatores ambientais, envolvidos com a dieta e estilo de vida, são os mais importantes a serem considerados na gênese de tumores. Os autores citam que aproximadamente 90% dos tumores do intestino grosso, estão relacionados com uma dieta rica em carne vermelha ou processada, com alto teor de gorduras, baixo teor de fibras, baixos consumos de cálcio, ácido

fólico e de vitamina D. Postula-se que altas concentrações de ferro presentes na carne vermelha promovam a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), como radicais hidroxila, aumentando o estresse oxidativo sobre o epitélio colônico e ocasionando a formação de pólipos e tumores malignos. (PIERRE et al., 2006). A primeira alteração, observada no cólon, que pode resultar em um câncer é a formação de focos de criptas aberrantes (FCA). FCA são aglomerados de glândulas anormais que aparecem antes mesmo do aparecimento do pólipo propriamente dito. Os cânceres de cólon frequentemente começam como um pólipo de crescimento benigno que se desenvolve no revestimento interno do cólon ou reto. Os pólipos mais comuns são denominados adenomas ou adenomatosos (STRYKER et al., 1987; PEREIRA, 2016). Os adenomas surgem a partir de células glandulares produtoras de muco, responsáveis pela lubrificação do intestino grosso. Embora todos os adenomas tenham a capacidade de se tornarem malignos, calcula-se que menos de 10 % deles progridam para um câncer invasivo (LEVINE e AHNEN, 2006; RISIO, 2010).

Estudos têm demonstrado fortes evidências de que o fenômeno inicial, que induz as células normais do cólon a se tornarem pólipos adenomatosos, pode ser desencadeado por agentes genotóxicos existentes no lúmen intestinal (RIBEIRO et al., 2008; PRIOLLI et al., 2013). Os agentes genotóxicos são caracterizados por uma atividade biológica primária ou metabólica, capaz de alterar o DNA. A genotoxicidade ocorre quando as células estão expostas a agentes tóxicos, resultando em mudanças na estrutura dos cromossomos (clastogênese) ou na sequência de bases do DNA (mutagenicidade) (RIBEIRO et al., 2008).

Os danos oxidativos no DNA, causados por espécies reativas de oxigênio (EROs), espécies reativas de nitrogênio (ERNs) ou pelos grupos metila, desencadeiam processos inflamatórios nas células da mucosa do colón, que aumentam o número e o tamanho dos focos de criptas aberrantes (FCA) presentes neste tecido (TRAVERSO et al., 2002). Essa inflamação, possivelmente, esteja envolvida com o desenvolvimento de câncer no trato digestivo (AMES et al., 1993; PEREIRA, 2016).

Os FCAs apresentam características topográficas e histológicas diferentes das criptas normais, podendo ser identificados por microscopia (BIRD, 1987). Assim como no câncer de cólon, os FCAs são também mais encontrados na porção distal do cólon (ALRAWI et al., 2006). Estas lesões apresentam algum grau de instabilidade genômica, sendo já identificados cerca de 40 mutações nos proto-oncogenes e nos genes supressores de tumor (GUPTA et al., 2007) e observados defeitos na via de reparo de bases mal pareadas (JACOB e PRAZ, 2002). Diversas alterações proteicas, como a expressão da COX-2, já foram detectadas em FCAs (KHAN et al., 2013). Entre os diferentes mecanismos moleculares de carcinogênese

colorretal, a via inflamatória tem ganhado destaque nas últimas décadas como fator predisponente. A inflamação comumente observada na doença de Crohn e na retocolite ulcerativa, promove mutações cumulativas que culminam com o desenvolvimento de displasia, adenomas e carcinomas colorretais (ALBERTS et al., 2000).

Os FCA são considerados biomarcadores intermediários confiáveis para carcinogênese colorretal, tanto em humanos quanto em modelos animais (BIRD, 1995). Elas seguem um padrão de múltiplos estágios teorizado por Fearon e Vogelstein (1990). Tais alterações são diretamente responsáveis por um evento específico, dentro da sequência que conduz ao câncer de cólon, contribuindo para o “início” da transformação neoplásica do epitélio saudável ou determinam a “progressão” para estágios mais malignos da doença (COLUSSI et al., 2013).

A carcinogênese colorretal é um processo de tumorização gradual que pode durar vários anos, iniciando com um único evento mutacional em uma célula, até a malignidade detectável. Por essa razão, várias ações quimiopreventivas podem ser utilizadas ou testadas em diversos modelos experimentais como, por exemplo, em modelos animais, com a finalidade de cessar ou alterar o curso do processo patológico (RONCUCCI e MARIANI, 2015). Atualmente, há duas estratégias de prevenção contra o câncer colorretal: a prevenção primária, que reduz a incidência da doença, por evitar ou impedir a ação dos fatores de risco; e a prevenção secundária, que visa à detecção precoce de lesões préneoplásicas ou neoplásicas no intestino grosso de populações com alta predisposição de desenvolvimento de câncer (VARMUS, 2006; RONCUCCI e MARIANI, 2015). Giovannucci (2002) cita que os dados disponíveis na literatura indicam que a prevenção primária do câncer colorretal é viável, pois, aproximadamente, 70 % deles podem ser, pelo menos em teoria, evitados por mudanças na dieta e no estilo de vida.

### **2.6.2 Indução da carcinogênese colorretal (CCR)**

Atualmente, existem diversos modelos animais para estudar o câncer colorretal. Cada um mimetiza, em parte, a carcinogênese colorretal humana, sendo possível, testar diversas modalidades terapêuticas que não seriam viáveis de serem testadas em seres humanos. A pesquisa básica do CCR cresceu com modelos animais, principalmente com roedores, que se tornaram os pilares para a compreensão da patogênese e para o desenvolvimento de novas terapias (MOSER et al., 1990; EDELMANN e EDELMANN, 2004; REICHLING et al., 2005; PEREIRA, 2016). Os roedores possuem muitas vantagens, como por exemplo, semelhanças anatômicas e biológicas com seres humanos, pequeno porte, facilidade de

manuseio, capacidade de reprodução, curto tempo de gestação e manipulação genética acessível, por essa razão, são muito utilizados em pesquisas pré-clínicas (MADDISON e CLARKE, 2005; FRESE e TUVESON, 2007; HE et al., 2015). Os modelos animais mais utilizados são aqueles onde a carcinogênese colorretal pode ser induzida quimicamente, pois proporcionam testes mais rápidos e de fácil reprodução, além de mimetizarem a via adenoma carcinoma que ocorre no câncer humano (TONG et al., 2011).

A Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC) define a 1,2-dimetilhidrazina DMH como um composto genotóxico e classifica-a na categoria do Grupo 2A de carcinógenos prováveis para humanos (IARC, 1999). A DMH e seu metabólito o azoximetano (AOM) são os carcinógenos mais usados em estudos de carcinogênese colônica. Ambos são de ação indireta, cuja ativação se inicia por uma série de reações oxidativas que ocorre no fígado, via CYP 2E1, e seus metabólitos são transportados pelo sangue ou pela bile para o intestino grosso, que é o principal alvo da ação desse agente (NEWELL e HEDDLE, 2004, TANAKA, 2009; MOURA, 2015). Os produtos do metabolismo desses compostos induzem a formação de grupos metil, que funcionam como adutos de DNA, promovendo mutações pontuais, separação aberrante de cromátides irmãs e indução de apoptose no cólon, que aumentam a proliferação de colonócitos. A DMH é usada como agente carcinogênico completo, pois induz as etapas de iniciação e promoção e possui uma alta especificidade de ação para o cólon de várias espécies de roedores (NEWELL e HEDDLE, 2004; MOURA, 2015). As lesões iniciais que surgem no cólon dos roedores são denominadas de FCA. Estas são consideradas lesões pré-neoplásicas e marcadoras de câncer de cólon, por isso utilizadas como biomarcador em estudos experimentais de quimioprevenção (CORPET, 2005; PEREIRA, 2016). Essas lesões são encontradas em seres humanos acometidos pela polipose ou câncer de cólon (RAJU, 2008; MOURA, 2015).

As criptas aberrantes (CA), descritas primeiramente por Bird em 1987, podem ser identificadas na mucosa do cólon, por apresentarem uma abertura luminal alterada, mais espessas e maiores que as adjacentes, que podem ser únicas ou formar focos (TUDEK et al., 1989). Essas mudanças também podem ser encontradas no CCR esporádico humano. Além disso, cada estágio da tumorigênese colorretal também abrange alterações epigenéticas particulares (PERSE e CERAR, 2011). Estas são observadas, com maior frequência, no cólon médio e distal, tanto em roedores como em humanos e são consideradas precursoras da carcinogênese de cólon (DI GREGORIO et al., 1997; BONONI et al., 1999; RODRIGUES et al., 2002; PERSE e CERAR, 2011). Os FCA apresentam índices de proliferação celular

maiores que os da mucosa normal (POLYAK et al., 1996; SHPITZ et al., 1997; MOURA, 2015).

A ocorrência da neoplasia colorretal tem sido historicamente embasada na sequência adenoma-carcinoma, tendo como substrato inicial a ocorrência de mutações cumulativas em diferentes genes. Estudos têm demonstrado fortes evidências de que o fenômeno capaz de induzir, mais precocemente, as células normais do cólon a se tornarem pólipos adenomatosos, é a promoção de dano na molécula de DNA, o qual pode ser desencadeado por agentes genotóxicos existentes no lúmen intestinal. (RIBEIRO et al., 2008; PRIOLLI et al., 2013; GUINNEY et al., 2015) Sabe-se que os danos oxidativos no DNA, por exemplo, causados por espécies reativas em excesso, provocam processos inflamatórios crônicos e ocasionam alterações arquitetural na mucosa colônica normal. (SCHMUTTE et al., 1996; WHEELER et al., 2003; WHEELER et al., 2005). Estas ERs, ao gerarem danos oxidativos ao DNA, podem desencadear mutações que comprometem genes responsáveis pelo controle do ciclo celular, gerando clones com autonomia proliferativa, iniciando assim o processo de carcinogênese colorretal. (WHEELER et al., 2003).

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Considerando que o chá das cascas de *Ximenia americana* L. vêm sendo utilizado na medicina popular para diversas patologias, este trabalho teve por objetivo avaliar o potencial tóxico (agudo, subagudo e crônico), citotóxico e mutagênico e os possíveis efeitos carcinogênicos e anticarcinogênicos, utilizando como organismo teste camundongos *M. musculus*, linhagem Swiss.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a toxicidade aguda, do extrato nebulizado da casca do caule de *X. americana* L.;
- Avaliar a toxicidade subaguda, ação citotóxica e mutagênica do extrato nebulizado da casca do caule de *X. americana* L. em eritrócitos da medula óssea de camundongos *M. musculus*, por meio do ensaio de MN, em análise de Eritrócitos Policromáticos (PCE) e Eritrócitos Normocromáticos (NCE);
- Avaliar a toxicidade crônica, ação citotóxica, mutagênica e carcinogênica do extrato nebulizado da casca do caule de *X. americana* L. em eritrócitos da medula óssea de camundongos *M. musculus*, por meio do ensaio de MN, análise de Eritrócitos Policromáticos (PCE), Eritrócitos Normocromáticos (NCE) e em cólon de camundongos, por meio do ensaio de focos de criptas aberrantes (FCA);
- Investigar os possíveis efeitos anticarcinogênicos (quimioprotetor e quimiopreventivo) do extrato nebulizado da casca do caule de *X. americana* L. sob o tecido colorretal de camundongos *M. musculus*, por meio de FCA e análise de redução de danos;
- Avaliar o efeito do extrato nebulizador da casca do caule de *X. americana* L. em células sanguíneas, utilizando para esta avaliação o ensaio de contagem diferencial de leucócitos (CD).

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Material

#### 4.1.1 Material Botânico

##### 4.1.1.1 Obtenção do Material Botânico

As cascas de *Ximenia americana* L. foram coletadas na região semiárida do Estado da Paraíba e sua exsicata foi depositada no Herbário Professor Jayme Coelho de Moraes da Universidade Federal da Paraíba, sob número de registro EAN-14049.

##### 4.1.1.2 Obtenção do Extrato nebulizado de cascas de *Ximenia americana* L.

O material vegetal foi seco a 40 °C, pulverizado em moinho de facas, com granulometria de 10 mesh. O extrato hidroalcoólico foi obtido por maceração a frio do material vegetal, utilizando como solvente água:etanol (30:70, v/v), por 3 dias, e submetido a secagem por aspersão em spray drying da marca LabPlant® com temperatura de entrada à 140 °C e fluxo de 3 mL/minuto. O adjuvante de secagem foi o dióxido de silício coloidal (Aerosil 200®), na proporção de 20 %, em relação ao resíduo seco.

#### 4.1.2 Agentes Químicos

A substância utilizada no controle positivo (CP) nos ensaios de mutagênese, para indução de micronúcleo, e anticarcinogênese, para a indução de carcinogênese colorretal, foi a 1,2-dimetilhidrazina (DMH marca Sigma®, CAS: n° 306-37-6), na concentração de 20 mg/kg, diluída em solução de EDTA (0,37 mg/ml).

#### 4.1.3 Animais Experimentais

Foram utilizados, em cada tratamento 5 camundongos machos da espécie *Mus musculus*, linhagem Swiss, com peso inicial aproximado de 30 gramas. Os animais, adquiridos da Universidade Estadual Paulista (UNESP)/Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, permaneceram por todo período experimental no biotério da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP)/Instituto de Biociências, Campus de Rio Claro. A temperatura do ambiente foi mantida a 22±2 °C e umidade relativa do ar a 55±5 %, em ciclo claro e escuro de 12 horas. Os animais receberam água e ração comercial *ad libitum*, por todo período experimental. Os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com os princípios éticos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e com a



aprovação do Comitê de Ética em Uso animal (CEUA) do IB/UNESP-Rio Claro, Protocolo: 26/2016.

## **4.2 Métodos**

### **4.2.1 Administração do extrato nebulizado de cascas de *X. americana* L.**

As diferentes concentrações do extrato nebulizado de *X. americana* L, obtidas por diluição do extrato nebulizado em água destilada, foram administradas aos camundongos, pelo método de gavagem gástrica, na proporção de 0,1 ml/10 g de peso corpóreo (p.c).

### **4.2.2 Administração da DMH (1,2-dimetilhidrazina)**

A concentração de 20 mg/kg de DMH, diluída em solução de EDTA (0,37 mg/ml), foi administrada aos animais pela via intraperitoneal (i.p), na proporção de 0,1 ml/10 g de peso corpóreo (p.c).

### **4.2.3 Administração do EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético)**

Foi preparada uma solução aquosa de EDTA a 37 % (pH 6,5), que foi utilizada na diluição da DMH utilizada nos grupos de controle positivo e nos grupos de anticarcinogenicidade. Enquanto esses grupos recebiam, via intraperitoneal (i.p.) a DMH diluída em EDTA, o grupo controle negativo recebeu, também por via i.p., apenas a solução de EDTA na proporção de 0,1 ml/10 g de peso corpóreo (p.c), para simular o mesmo estresse nos animais experimentados.

### **4.2.4 Coleta de sangue para contagem diferencial de leucócitos (CD)**

As coletas de sangue foram realizadas em dois períodos, sendo eles, 24 h antes do início da experimentação e momentos antes da eutanásia, que aconteceu 24 h após a última administração do extrato. Foi coletado por punção caudal, com o auxílio de uma agulha de calibre de 30x7mm, uma gota de sangue periférico. Este sangue foi utilizado para a confecção de esfregaços sanguíneos, que foram fixados em álcool 70 %. Após a secagem, as lâminas foram coradas, por 5 minutos, no corante Leishman, seguido de adição de água destilada e deixadas para corar por mais 10 minutos. Após esse processo, as lâminas foram deixadas em temperatura ambiente, até sua completa secagem, para serem, então, montadas com Entelan<sup>®</sup>, para análise posterior.

#### 4.2.5 *Eutanásia dos animais e coleta do material biológico*

Após o período experimental, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical, sem a utilização de meios analgésicos. Seus órgãos foram retirados, observados macroscopicamente, pesados e devidamente acondicionados, para possíveis análises posteriores.

O peso relativo dos órgãos foi calculado pela seguinte fórmula:

$$\text{Peso Relativo} = a / b$$

Onde:

a = peso do órgão

b = peso corpóreo do animal

#### 4.2.6 *Bioensaios*

##### 4.2.6.1 *Ensaio de micronúcleo em medula óssea (MN)*

Após a eutanásia dos animais, foram retirados, com o auxílio de uma tesoura, os fêmures dos mesmos. Para extração da medula óssea, foram realizadas secções nas epífises dos ossos, para que o canal medular ficasse exposto. Com auxílio de uma seringa, foi introduzida uma agulha no canal medular, para a injeção 3 mL de soro bovino fetal (SBF). Esse processo foi repetido por várias vezes, até a total retirada da medula. O material foi acondicionado em tubos falcon<sup>®</sup> e centrifugados por 5 minutos a 1000 rpm. O sobrenadante foi descartado e a suspensão obtida foi homogeneizada, para então serem confeccionados os esfregaços medulares. As lâminas com as extensões medulares foram fixadas em álcool 70 % por 5 minutos, secas e coradas. A coloração seguiu as etapas: passagem pela solução de Wright por 3 minutos; por soluções de Wright e tampão fosfato pH 7,4 (1:1) por 1 minuto; e em uma mistura de tampão fosfato, água destilada e corante Giemsa (10:10:1) por 10 minutos. Na sequência, as lâminas foram lavadas em água corrente, para a retirada do excesso de corante, e depois de secas, montadas em Entelan<sup>®</sup>. Este protocolo de coloração é indicado para a observação diferencial dos eritrócitos policromáticos (PCEs) e eritrócitos normocromáticos (NCEs) (RIBEIRO et al.,2003). Foram confeccionadas, para cada animal experimentado, 2 lâminas, que foram observadas, em teste-cego, em microscópio de luz (objetiva de 100x).

##### 4.2.6.1.1 *Ensaio de citotoxicidade*

Foram contados 500 PCEs por animal e observados, dentre eles, os NCEs. A frequência dos NCEs foi calculada pela fórmula:

Número de PCE/número de NCE

Os resultados obtidos foram submetidos ao teste estatístico correspondente a normalidade encontrada.

#### 4.2.6.1.2 Ensaio de mutagenicidade

Foram contabilizados o número de MNPCE presentes em 4000 PCE/animal. Os valores médios de MNPCE obtidos em cada tratamento realizado foram submetidos ao teste estatístico de acordo normalidade encontrada.

#### 4.2.6.2 Ensaio de Focos de Criptas Aberrantes (FCA)

Para o desenvolvimento dos ensaios de FCA e avaliação carcinogênica e anticarcinogênica de cólon, foi retirado o intestino grosso dos animais e realizada, com o auxílio de um fio de algodão, a ligadura na porção do ceco e na porção do reto. O intestino foi lavado com solução fisiológica 9 %, injetando, com auxílio de uma seringa, essa solução no intestino, para a retirada das fezes. Quando o intestino ficou completamente inflado, o mesmo foi seccionado longitudinalmente, com o auxílio de uma tesoura, e suas extremidades foram presas com alfinetes emborrachados em placas de isopor<sup>®</sup>. Essa placa foi mergulhada em solução de formalina tamponada a 10 %, para fixação por, no mínimo, 24 horas.

No momento da análise, o intestino foi corado com Giemsa 10 % por 10 minutos e montado em uma lâmina de vidro, de modo que a mucosa ficasse voltada para cima. A análise das lâminas foi feita em microscopia de luz, (objetiva de 40x), para avaliação, identificação e quantificação dos FCA, de acordo com a técnica de Bird (1987). Foram contabilizados os FCA que apresentaram < 3 CA e > 3CA por animal, números esses que foram submetidos a análise estatística, levando em consideração a média dos dois parâmetros (< 3 e > 3), de acordo com o teste de normalidade.

#### 4.2.6.3 Redução de danos de FCA

A porcentagem de redução de danos de FCA no cólon dos camundongos, ocasionadas pelos extratos de *X. americana* L., foi calculada pela fórmula:

$$\% \text{ RD} = [(a - b) / (a - c)] \times 100$$

Onde:

a = média de FCA do CP;

b = média de FCA dos tratamentos;

c = média de FCA do CN.

#### 4.2.6.4 Ensaio de contagem diferencial de leucócitos (CD)

As coletas e análise das lâminas de esfregaços sanguíneos foram realizadas conforme já descrito no item 4.2.4. As lâminas, foram observadas em microscópio de luz (objetiva de 100x), em teste cego, sendo contado um total de 100 leucócitos/animal. A metodologia aplicada na realização da contagem diferencial destas células permitiu determinar o percentual e o número absoluto de linfócitos, neutrófilos, monócitos, eosinófilos e basófilos dos animais experimentados.

#### 4.2.7 Delineamentos experimentais

##### 4.2.7.1 Avaliação de toxicidade oral aguda, citotoxicidade e mutagenicidade do extrato nebulizado de cascas de *X. americana* L. em camundongos *Mus musculus*

A metodologia usada para a avaliação da toxicidade aguda, citotoxicidade e mutagenicidade do extrato nebulizado de cascas do caule de *X. americana* L. seguiu o protocolo descrito no Guia OECD 423/2001 (Toxicidade Oral Aguda - Método de Classe Tóxica Aguda). Foi administrado, via gavagem, 0,1 ml/g de p.c. de extrato nebulizado de *X. americana* L. nas concentrações de 50; 250; 500 e 2000 mg/kg, sendo 5 animais/grupo. O grupo Controle Negativo (CN) (n= 5 animais) recebeu apenas água, totalizando 25 animais experimentados neste estudo. As concentrações e o CN foram administrados uma única vez. Os animais foram observados no período de 0, 15, 30, 60, 120, 240 e 360 minutos, posteriores à administração, e durante os 14 dias seguintes, a cada 24 horas.

Os parâmetros de toxicidade foram avaliados pelo número de mortes, e pelo estado geral de comportamento, como alteração na locomoção, alteração do tônus muscular, frequência respiratória, excitação, hipnose e convulsão. Foram observados também a variação de peso e o consumo de ração e de água. Ao final do período dos 15 dias do ensaio (16° dia de experimentação), os animais foram eutanasiados, por deslocamento cervical, e seus órgãos pesados e avaliados macroscopicamente. A medula óssea do fêmur dos animais foi coletada e utilizada na avaliação da citotoxicidade e mutagenicidade do extrato, por meio do ensaio do micronúcleo (MN) (Tabela 1).

#### 4.2.7.2 Avaliação toxicidade oral subaguda, citotoxicidade e mutagenicidade do extrato nebulizado de cascas de *X. americana* L. em camundongos *Mus musculus*

Foram estabelecidas, a partir dos ensaios de toxicidade aguda, três concentrações do extrato nebulizado (150, 250, 350 mg/kg), que foram administradas (0,1 ml/g de p.c.), por 28 dias consecutivos, via gavagem, em camundongos *M. musculus*, sendo 5 animais/grupo. O grupo CN (n= 5 animais) recebeu apenas água, totalizando 25 animais experimentados neste ensaio. Após o final do experimento, os animais foram observados quanto aos parâmetros de toxicidade, variação de peso, consumo de água e de ração. Ao fim do período de 28 dias de tratamento, e 29 dias de experimentação, os animais foram eutanasiados, por deslocamento cervical, e seus órgãos pesados e avaliados macroscopicamente. A medula óssea do fêmur de todos os animais foi coletada e utilizada na avaliação da citotoxicidade e mutagenicidade do extrato, por meio do ensaio do MN (Tabela 1).

**Tabela 1:** Desenho experimental dos tratamentos realizados nos ensaios de toxicidade aguda e subaguda, com diferentes concentrações do extrato nebulizado de cascas de *X. americana* L. e diferentes períodos de experimentação

Ensaio	Concentrações	Períodos		
		Administração	Observação	Eutanásia
<b>Toxicidade aguda</b>	CN			
	50 mg/kg			
	250 mg/kg	1 dia	14 dias	15° dia
	500 mg/kg			
	2000 mg/kg			
<b>Toxicidade Subaguda</b>	CN			
	150 mg/kg/dia			
	250 mg/kg/dia	28 dias	28 dias	29° dia
	350 mg/kg/dia			

CN: controle Negativo

#### 4.2.7.3 Avaliação da toxicidade oral crônica, citotoxicidade e mutagenicidade do extrato nebulizado de cascas de *X. americana* L. em medula óssea e da carcinogenicidade em cólon de camundongos *Mus musculus*

Para as avaliações da toxicidade crônica, da citotoxicidade e da mutagenicidade (pelo ensaio de MN em medula óssea) e a avaliação da carcinogenicidade (pelo ensaio de focos de criptas aberrantes- FCA) em intestino grosso na porção colorretal, foi administrado, via gavagem, 0,1 ml/10g de p.c. de extrato nebulizado da casca do caule de *X. americana* L. nas

concentrações de 50, 150, 250 e 350 mg/kg/dia (determinadas pelo teste de toxicidade aguda do extrato), sendo 5 animais/grupo. Os grupos CN e CP receberam água, diariamente, durante todo o período do experimento. Da 5<sup>a</sup> a 8<sup>a</sup> semana, o CN também recebeu uma dose semanal de EDTA e o CP uma dose semanal de DMH mais água via gavagem gástrica diariamente (Tabela 2). Os animais dos grupos tratados com *X. americana* L. receberam o extrato nebulizado diariamente, via gavagem gástrica, durante as 12 semanas de experimentação, sendo que: da primeira à quarta semana, foi administrado, diariamente o extrato nebulizado de *X. americana* L.; da quinta a oitava semana foi administrado, diariamente, o extrato nebulizado de *X. americana* L. juntamente com uma dose semanal de EDTA, administrado uma vez por semana. Da nona à décima segunda semana, os animais receberam diariamente, o extrato nebulizado de *X. americana*. Todos os ensaios (grupo tratado com *X. americana* L. e os grupos controles) foram realizados com n=5 indivíduos cada, totalizando 30 animais experimentados.

As coletas de sangue periférico, usadas para contagem diferencial de leucócitos, ocorreram como descrito no item: 4.2.4. Por todo o período experimental, os animais foram tratados com água destilada e ração comercial *ad libitum*. Após as 12 semanas, os animais foram submetidos à eutanásia, por deslocamento cervical, e então realizada a coleta da medula óssea do fêmur, para a realização do ensaio do micronúcleo (MN), e coletado o intestino grosso, para a realização do ensaio de (FCA), conforme apresentado na tabela 2. Também foram coletados, após a eutanásia, todos os órgãos, que foram pesados e observados macroscopicamente. Estes órgãos foram devidamente armazenados, para possíveis avaliações futuras.

**Tabela 2:** Desenho experimental dos tratamentos realizados nos ensaios de toxicidade crônica, citotoxicidade, mutagenicidade e carcinogenicidade, com diferentes concentrações do extrato nebulizado de casca de *X. americana* L.

Tratamentos	Período		
	1° a 4° semana	5° a 8° semana	9° a 12° semana
CN	Água	Água + EDTA	Água
CP	Água	Água + DMH	Água
Trat. Crônico	<i>X. americana</i> L.	<i>X. americana</i> L.+ Água	<i>X. americana</i> L.

CN: Controle Negativo; CP: Controle Positivo; Água administrada via gavagem; *X. americana* L. administrada via gavagem; EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético, administrado via intraperitoneal; DMH:1,2-dimetilhidrazina, administrado via intraperitoneal.

#### 4.2.7.4 Avaliação da atividade anticarcinogênica de cólon do extrato nebulizado de cascas de *X. americana* L. em camundongos *Mus musculus*

A avaliação do efeito anticarcinogênico foi realizada para quatro diferentes concentrações do extrato nebulizado de cascas do caule de *X. americana* L. (50, 150, 250 e 350mg/kg/dia). Os animais foram subdivididos em 6 diferentes grupos experimentais: grupos controle CN, CP e grupos tratados com extratos nebulizado de *X. americana* L. (pré-tratamento; tratamento simultâneo; pós-tratamento e tratamento contínuo), submetidos às diferentes concentrações testadas. Cada grupo contou com n=5 animais, totalizando 90 animais experimentados. Os animais foram submetidos ao tratamento por 12 semanas conforme protocolo sugerido por Mauro et al. (2008), com modificações. O delineamento dos tratamentos está disposto na tabela 3.

##### 4.2.7.4.1 Grupos Controles

###### 4.2.7.4.1.1 Tratamento Controle Negativo (CN)

Os animais receberam da primeira à quarta semana de experimentação, via gavagem gástrica, 0,1ml/10g de peso corpóreo (p.c) de água. Da quinta à oitava semana, os animais receberam diariamente água, via gavagem gástrica, e, semanalmente, 0,37 mg/ml da solução de EDTA, via intraperitoneal- i.p, sendo 0,1ml/10g p.c/semana. Este procedimento foi adotado para provocar o mesmo estresse dos animais que receberam intraperitonealmente o agente indutor de mutagenicidade e carcinogenicidade (DMH). Da oitava à décima segunda semana, os animais receberam diariamente (via gavagem gástrica) água.

As coletas de sangue periférico, utilizadas para contagem diferencial de leucócitos, ocorreram conforme descrito no item: 4.2.4. Os animais foram tratados com água e ração comercial *ad libitum*, durante todo o período experimental.

Após as 12 semanas, os animais foram submetidos à eutanásia, por deslocamento cervical, e então coletado o intestino grosso, para a realização do ensaio de (FCA), conforme descrito no item: 4.2.6.1.3. Também foram coletados, após a eutanásia, todos os órgãos que foram pesados e observados macroscopicamente. Estes órgãos foram devidamente armazenados, para possíveis avaliações futuras.

###### 4.2.7.4.1.2 Tratamento Controle Positivo (CP)

Os animais receberam água, via gavagem gástrica, da primeira à quarta semana de experimentação. Da quinta à oitava semana, eles receberam quatro doses de DMH, (via i.p),

sendo administrada uma dose por semana, na concentração de 20mg/kg, nos demais dias deste período foi administrado água, via gavagem gástrica. Da nona à décima segunda semana, os animais receberam água, diariamente, por gavagem gástrica. A alimentação, eutanásia e as coletas ocorreram conforme descrito no item 4.2.7.4.1.1.

#### 4.2.7.4.2 Grupos de tratamento com o extrato nebulizado de casca de *X. americana* L.

##### 4.2.7.4.2.1 Pré-Tratamento

Os animais receberam, da primeira à quarta semana, via gavagem gástrica, extrato nebulizado de cascas de *X. americana* L. Da quinta à oitava semana, foram administradas (via i.p) quatro doses de DMH, sendo uma dose por semana, além de receberem também, diariamente, água. Da nona à décima segunda semana, os animais receberam, diariamente, água por via gavagem gástrica. A alimentação, eutanásia e coletas ocorrerão conforme descrito no item 4.2.7.4.1.1.

##### 4.2.7.4.2.2 Tratamento Simultâneo

Os animais receberam, entre a primeira e a quarta semana água, via gavagem gástrica. Da quinta à oitava semana, foram administrados, diariamente, o extrato nebulizado de cascas de *X. americana* L., juntamente com a administração de uma dose semanal de DMH (via i.p). Da nona à décima segunda semana, os animais receberam apenas água. Após este período, ocorreu a eutanásia e a coletas como descrito no item 4.2.7.4.1.1.

##### 4.2.7.4.2.3 Pós-tratamento

Neste tratamento, os animais receberam água da primeira à quarta semana (via gavagem). Da quinta à oitava semana, eles receberam, diariamente, água (via gavagem) e quatro doses de DMH (via i.p), sendo uma dose desta droga por semana. Da nona à décima segunda semana, os animais receberam extrato nebulizado de cascas de *X. americana* L. diariamente. Após este período, ocorreu a eutanásia e as coletas ocorreram, conforme descrito no item 4.2.7.4.1.1.

##### 4.2.7.4.2.4 Tratamento Contínuo

Os animais receberam, diariamente, da primeira à quarta semana (via gavagem), o extrato nebulizado de cascas de *X. americana* L. Da quinta à oitava semana, foi administrado, diariamente, via gavagem, o extrato de *X. americana* L., juntamente com as quatro doses de



DMH (via i.p), sendo uma dose por semana. Após este período, da nona à décima segunda semana, os animais receberam, diariamente, o extrato de *X. americana* L. A eutanásia e as coletas ocorreram como descrito no item 4.2.7.4.1.1.

**Tabela 3:** Desenho experimental dos tratamentos realizados nos ensaios de antimutagenese e anticarcinogênese com diferentes concentrações de do extrato nebulizado de cascas de *X. americana* L.

Tratamentos	Período		
	1° a 4° semana	5° a 8° semana	9° a 12° semana
CN	Água	Água + EDTA	Água
CP	Água	Água + DMH	Água
Pré-tratamento	<i>X. americana</i> L.	Água + DMH	Água
Trat. Simultâneo	Água	<i>X. americana</i> L. + DMH	Água
Pós- Tratamento	Água	Água + DMH	<i>X. americana</i> L.
Trat. Contínuo	<i>X. americana</i> L.	<i>X. americana</i> L. + DMH	<i>X. americana</i> L.

CN: Controle Negativo; CP: Controle Positivo; EDTA: ácido etilenodiamino tetraacético, administrado via intraperitoneal; DMH:1,2-dimetilhidrazina, administrado via intraperitoneal, Água administrada via gavagem; *X. americana* L. administrada via gavagem

#### 4.2.8 Análises estatísticas

A análise estatística dos dados foi realizada de acordo com a distribuição dos dados, conferidos pelo teste de normalidade D'Agostino & Pearson. Para os dados paramétricos, foi aplicado o teste estatístico ANOVA/Dunnett e, para os dados não paramétricos, o teste de Kruskal-Wallis/Dunn's. Para as análises estatísticas, os dados foram submetidos ao software IBM® SPSS® Statistics (versão 22). Os resultados que obtiveram níveis de significância ( $p < 0,05$ ), foram considerados estatisticamente significativos.

## 5. RESULTADOS

**ARTIGO 1-**Avaliação da toxicidade aguda e subaguda, citotoxicidade e mutagenicidade do extrato nebulizado de cascas *Ximenia americana* L. para camundongos *Mus musculus*

**ARTIGO 2-** Avaliação da toxicidade crônica, citotoxicidade, mutagenicidade e carcinogenicidade do extrato nebulizado de cascas *Ximenia americana* L. em camundongos *Mus musculus*

**ARTIGO 3-**Efeito quimiopreventivo do extrato nebulizado de cascas de *X. americana* L. para carcinogênese colorretal, induzida pela 1,2-dimetilhidrazina, em camundongos *Mus musculus*

**Artigo 1: Avaliação da toxicidade aguda e subaguda, citotoxicidade e mutagenicidade do extrato nebulizado de cascas de *Ximenia americana* L. para camundongos *Mus musculus***

Jaqueline Aparecida de Oliveira Dalavilla<sup>1</sup>, Ana Claudia Dantas de Medeiros<sup>2</sup>, Maria Aparecida Marin-Morales<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>UNESP - Universidade Estadual Paulista, Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Av 24-A, 1515, CEP 13506-900, Rio Claro, São Paulo, Brasil.

<sup>2</sup>UEPB - Universidade Estadual da Paraíba, Departamento de Farmácia, Centro de Ciências Biológicas e da saúde, Rua Baraúnas, 351, CEP 58429-500, Campina Grande, Paraíba, Brasil.

\*Autor correspondente. Tel.: +55 19 3526 4143; fax: +55 19 35360009.

e-mail: marin.morales@unesp.br

**Resumo**

*Ximenia americana* L. é uma planta muito utilizada na medicina popular, com vários estudos científicos comprovando seus fins terapêuticos. Porém, até o momento, não existem estudos com esta espécie, que avalie o efeito toxigenético que o extrato nebulizado de *X. americana* L. pode ocasionar à saúde. Este trabalho avaliou a toxicidade aguda e subaguda e o efeito toxigenético, pelo ensaio de micronúcleo em medula óssea de camundongos *Mus musculus* do extrato nebulizado das cascas do caule de *X. americana* L., de acordo com as diretrizes estabelecidas pela OECD. Nenhum sinal de toxicidade ou mortalidade foram observados na toxicidade aguda, o que permite classificar o extrato estudado como de baixa toxicidade. A partir desse estudo, foram selecionadas três concentrações para serem usadas no teste de toxicidade subaguda, os resultados mostraram que a maior concentração testada neste ensaio (350 mg/kg/dia) induziu a morte de um indivíduo, dos cinco expostos ao mesmo extrato na avaliação toxigenética deste mesmo ensaio não ocorreu efeito citotóxico ou mutagênico. No ensaio de toxicidade aguda, foi observada uma diminuição significativa no peso relativo dos órgãos, como: coração, fígado, pulmão, rins, testículos e tireoide. Estes resultados podem estar relacionados aos constituintes fitoquímicos presentes no extrato nebulizado de *X. americana* L., que podem apresentar um potencial pró-oxidante, dado pela presença de

flavonoides, saponinas, antraquinonas, alcaloides, e terpenoides que, em altas concentrações, podem levar a danos oxidativos.

**Palavras-chave:** Dose Letal 50%; toxicidade de doses repetidas; avaliação toxigenética, micronúcleo; alteração na massa dos órgãos, ameixa do mato.

## 1. Introdução

O uso de plantas medicinais, há muito tempo, está presente na cultura popular, devido a visão de que o que é natural não faz mal à saúde, portanto consideradas de uso seguro (ASIIMWE et al., 2014). Porém, existem relatos de que muitas plantas medicinais podem ser tóxicas e desencadear sérios efeitos adversos aos organismos (HAQ, 2004; PARK et al., 2010; GEORGE, 2011). De todos os tratamentos a base de plantas já realizados, poucos foram avaliados em ensaios clínicos, quanto à eficácia e segurança (CHENG et al., 2009), mas muitos estudos vêm sendo realizados com produtos naturais, com o propósito, apenas, de obtenção de moléculas ativas com potenciais terapêuticos (TRAESEL et al., 2014). Entretanto, esses produtos, para serem usados de forma segura devem, além de passar por estudos químicos, passarem também por avaliação de sua toxicidade (REYES-GARCIA, 2010; MELO et al., 2011). Assim, é necessário avaliar a relação entre o risco e o benefício do uso de produtos naturais, por meio de estudos farmacodinâmicos e toxicológicos (FARIAS, 2007).

A espécie *Ximenia americana* L. é uma planta tropical encontrada na África, Índia, Nova Zelândia, América Central e América do Sul (SACANDE e VAUTIER, 2006; FEYSSA et al., 2012; SARMENTO et al., 2015). Diversos nomes são atribuídos a esta planta que popularmente é conhecida no nordeste do Brasil como ameixa do mato, ameixa brava, ameixa azeda ou ameixa do sertão (SILVA et al., 2008; ARAÚJO et al., 2009). *X. americana* L., amplamente utilizada na medicina popular (GRONHAUG et al., 2008; JAMES et al., 2008; LE et al., 2012), é uma planta arbórea de 3-4 metros de altura, que pertence a família Olacaceae. Apresenta casca fina de cor avermelhada ou cinza, com textura lisa ou pouco rugosa; folhas pequenas, simples, inteiras alternadas, pecioladas, oblongas, glabras; e flores branco-amareladas, aromáticas, com pétalas recurvadas, dispostas em racemos curtos, axilares ou terminais (LORENZI e MATOS, 2002; MATOS et al., 2007; BRASILEIRO et al., 2008; LE et al., 2012). Possui frutos aromáticos do tipo drupa subglobosa de cor amarelo alaranjado, medindo de 1,5 a 2 cm de diâmetro, envolvendo uma única semente com amêndoa branca. Apresenta polpa de consistência firme e sabor doce (EROMOSELE e EROMOSELE, 2002).

Análises fitoquímicas revelaram a presença de compostos bioativos em *X. americana* L. como as saponinas, carboidratos, glicosídeos cianogênicos, flavonóis, taninos, alcaloides, antraquinonas e terpenos (OGUNLEYE e IBITOYE, 2003; JAMES et al., 2007; MAIKAI et al., 2008; CARTAXO et al., 2010).

Na medicina popular, as cascas do caule de *X. americana* L. são muito utilizadas como medicinais e têm sido indicadas para tratamento de várias patologias, como: esquistossomose, febre, diarreia, micose e dor de dente (BURKILL, 1997; MORAIS et al., 2005), malária, ulcerações lepróticas e doenças de pele (OGUNLEYE e IBITOYE, 2003), ferimentos e falta de ar (FRANCO e BARROS 2006), gastrite, infecção de garganta, corrimento vaginal (ALVES et al., 2007), inflamação e prisão de ventre (ROQUE et al., 2010), inflamação do útero e ovários, cicatrizante, limpeza do útero, limpeza do sangue, aborto, anemia, úlcera estomacal, câncer, infecção urinária, coceira, feridas e queimaduras (OLIVEIRA et al., 2010).

Extratos nebulizados são extratos secos obtidos por processos de atomização. A nebulização consiste em dispersar um extrato líquido hidroalcoólico, associado a um composto adjuvante (como por exemplo o aerosil<sup>®</sup>), em minúsculas gotículas e secá-las, instantaneamente, em uma corrente de ar quente, gerando, neste processo, um pó finíssimo. Como esse processo de dispersão e secagem é muito rápido, o extrato nebulizado sofre pouquíssimas perdas e transformações de seus constituintes. Sendo assim, é amplamente utilizado na farmacologia, o que faz com que muitos laboratórios farmacêuticos realizem esse tipo de secagem, para que essas sejam disponibilizadas para uso em formulações fitoterápicas (COUTO, 2011).

Muitos estudos fitoquímicos já foram realizados com a espécie *X. americana* L., comprovando que esta planta tem potencial para ser usada como medicinal (MAIKAI et al., 2008; ALMEIDA et al. 2016; LIMA et. al, 2016; ARAGÃO et al., 2018; SANTANA et al., 2018), contudo poucos estudos avaliaram se ela apresenta alguma potencialidade tóxica. Alguns autores avaliaram a toxicidade aguda do extrato nebulizado das cascas do caule de *X. americana* em ratos Wistar (MAIKAI et al., 2008; AGYIGRA et al., 2017; ARAGÃO et al., 2018) e, em todos esses estudos, o extrato estudado não apresentou sinais de toxicidade, para o período avaliado. Até o momento, não foram encontrados na literatura científica estudos de citotoxicidade e mutagenicidade para a planta *X. americana* L., independente do tipo de formulação usada.

Considerando que a espécie *X. americana* L. é uma planta amplamente utilizada na medicina popular, para vários fins terapêuticos; é bem conhecida quanto aos seus constituintes

fitoquímicos, mas pouco estudada quanto aos seus possíveis efeitos tóxicos; ainda não estudada, quanto aos seus potenciais citotóxico e mutagênico; e tampouco avaliada, na forma de extrato nebulizado, este estudo teve como objetivo avaliar o potencial efeito tóxico, citotóxico e mutagênico de extrato nebulizado das cascas do caule de *X. americana* L. em medula óssea de camundongos *Mus musculus*.

## 2. Material e Métodos

### 2.1. Material vegetal e preparação do extrato

A espécie *Ximenia americana* L., avaliada neste estudo, foi coletada na região semiárida do Estado da Paraíba e sua excicata depositada no Herbário Professor Jayme Coelho de Moraes da Universidade Federal da Paraíba, sob o número de registro EAN-14049. As cascas dos caules desta planta foram secas a 40 °C, pulverizadas em moinho de facas e processadas por maceração a frio com água e etanol (30/70 %, respectivamente), para a obtenção do extrato hidroalcoólico. O extrato hidroalcoólico foi submetido, por 3 dias, a secagem por aspersão em *spray drying* (LabPlant<sup>®</sup>), com temperatura de entrada de 140 °C e fluxo de 3 mL/min. O adjuvante de secagem foi o dióxido de silício coloidal (Aerosil 200<sup>®</sup>), na proporção de 20 %, em relação ao resíduo seco.

### 2.2. Animais

Foram utilizados, em cada tratamento, 5 camundongos machos da espécie *Mus musculus*, linhagem Swiss, com peso inicial aproximado de 30 gramas. Os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com os princípios éticos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e com a aprovação do Comitê de Ética em Uso animal (CEUA) do IB/UNESP-Rio Claro (Protocolo: 26/2016).

### 2.3. Ensaio de Toxicidade aguda

A toxicidade aguda do extrato nebulizado de cascas de *X. americana* L. foi determinada com base no protocolo do Guia OECD 423/2001 (Toxicidade Oral Aguda-Método de Classe Tóxica Aguda). Para a realização deste bioensaio, foi administrado, uma única vez, pelo método de gavagem gástrica em camundongos *Mus musculus*, 0,1 ml/10 g de p.cdo extrato nebulizado de cascas de *X. americana* L., nas concentrações de 50, 250, 500 e 2000 mg/kg. O grupo Controle Negativo (CN) recebeu a mesma dose de água, em substituição ao extrato, para simular o mesmo estresse sofrido pelo animais tratados (Tabela 1). Os animais foram observados nos tempos 0, 15, 30, 60, 120, 240 e 360 minutos após a

administração e a cada 24 horas, pelos 14 dias seguintes. Os parâmetros de toxicidade foram avaliados pelo número de mortes, estado geral de comportamento, como alteração na locomoção, alteração do tônus muscular, frequência respiratória, excitação, hipnose, convulsão, salivação, pilo-ereção, lacrimejamento, diarreia, efeitos sobre respiração e contorções abdominais. Foram observados também variação de peso corpóreo e de consumo de ração e água. Ao fim do período de 14 dias do início do experimento, os animais foram eutanasiados, por deslocamento cervical, seus órgãos retirados, para serem pesados e avaliados macroscopicamente. Neste ensaio de toxicidade aguda, foram experimentados um total de 25 animais, n= 5 animais/grupo de tratamento.

#### **2.4. Ensaio da Toxicidade subaguda**

A toxicidade subaguda do extrato nebulizador de cascas de *X. americana* L. foi determinada com base no protocolo do Guia OCDE 407/2008 (Toxicidade de doses repetidas). A partir do ensaio de toxicidade aguda, foram determinadas três concentrações (150, 250 e 350 mg/kg/dia) que foram administradas, na proporção de 0,1 ml/10 g (p.c) aos camundongos *Mus musculus* para a avaliação da toxicidade subaguda. Os animais receberam as concentrações de extrato descritas acima uma vez ao dia, por 28 dias consecutivos. O grupo CN recebeu, durante o mesmo período de experimentação, apenas água, que foi administrada da mesma forma dos tratamentos com *X. americana* L. (via gavagem gástrica) (Tabela 1). Durante o período experimental os parâmetros de toxicidade foram observados conforme o item 2.3. Após a eutanásia seus órgãos foram retirados, pesados e avaliados macroscopicamente, a medula óssea foi coletada para a realização do teste de micronúcleo (MN), para avaliação do potencial citotóxico e mutagênico do extrato. Neste teste de toxicidade subaguda, foram experimentados 20 animais, n=5 animais/grupo de tratamento.

#### **2.5. Delineamento Experimental**

Os experimentos realizados neste estudo, foram processados em momentos diferentes e estão descritos na tabela 1.

**Tabela 1:** Delineamento experimental dos tratamentos realizados com as diferentes concentrações de *Ximenia americana* L. e os períodos de experimentação aplicados em cada teste realizado

Ensaio	Concentrações	Períodos		
		Administração	Observação	Eutanásia
<b>Toxicidade Aguda</b>	CN			
	50 mg/kg			
	250 mg/kg	1 dia	14 dias	15° dia
	500 mg/kg			
	2000 mg/kg			
<b>Toxicidade Subaguda</b>	CN			
	150 mg/kg/dia	28 dias	28 dias	29° dia
	250 mg/kg/dia			
	350 mg/kg/dia			

CN: Controle Negativo.

## 2.6. Ensaio de Micronúcleo (MN)

A avaliação de MN em células de medula óssea de roedores foi realizada seguindo os protocolos descritos por Schimid (1975), Ribeiro (2003), Maistro (2014) e OECD 474 (2016). Para extração da medula óssea, foram realizadas secções nas epífises dos fêmures, para que o canal medular ficasse exposto. Os fêmures de cada animal, com as epífises já abertas, foram lavados, em tubos Falcon<sup>®</sup>, injetando no canal medular, com o auxílio de uma seringa, 3 ml de soro fetal bovino (SFB). Esse soro foi aplicado no canal medular por várias vezes, até que toda medula fosse retirada. Os tubos foram centrifugados por 5 minutos a 1000 rpm. O sobrenadante foi descartado e a suspensão celular obtida foi homogeneizada para ser usada na confecção de lâminas das distensões medulares. A coloração das lâminas seguiu o protocolo descrito por Ribeiro et al. (2003), com modificações, conforme descrito a seguir. As lâminas foram fixadas em álcool 70 % por 5 minutos, secas e coradas, sequencialmente, pela solução de Wright por 3 minutos, solução de Wright e tampão fosfato pH 7,4 (1:1) por 1 minuto, e em uma mistura de tampão fosfato, água destilada e corante Giemsa (10:10:1), por 10 minutos. Na sequência, as lâminas foram lavadas em água corrente, para a retirada do excesso de corante e, depois de secas, foram montadas em Entelan<sup>®</sup>. As lâminas de cada animal experimentado foram analisadas, em teste cego, em microscopia de luz (objetiva de 100x).

## 2.7. Análise do Potencial Citotóxico

A citotoxicidade do extrato nebulizado de *X. americana* L. foi estimada pelo número de NCE presente dentre 500 PCE analisadas por animal (n=5), nos diferentes ensaios



realizados. O número de PCE foi dividido pelo número de NCE e os resultados obtidos neste cálculo, para os diferentes tratamentos, foram submetidos a análise estatística, de acordo com o teste de normalidade.

## **2.8. Análise do Potencial Mutagênico**

Foram contados os MNPCE dentre 4000 PCE analisados por animal, nos diferentes ensaios realizados. O número de MNPCE/animal foi comparado estatisticamente, com os resultados obtidos no CN.

## **2.9. Cálculo do Peso relativo dos órgãos**

O peso relativo dos órgãos foi calculado pela seguinte fórmula:

$$\text{Peso Relativo} = a / b$$

Onde:

a = peso do órgão

b = peso corpóreo do animal

## **2.10. Análise estatística**

A comparação dos resultados obtidos nas análises foi realizada de acordo com a distribuição dos dados, conferidos pelo teste de normalidade D'Agostino & Pearson. Foi aplicado para os dados paramétricos o teste estatístico ANOVA/Dunnet e para os não paramétricos o de Kruskal-Wallis/Dunn's. Para essas análises estatísticas, foi usado o software IBM® SPSS® Statistcs (versão 22). Os resultados que obtiveram níveis de significância ( $p < 0,05$ ), quando comparados com o controle negativo, foram considerados estatisticamente significativos.

## **3. Resultados**

### **3.1. Exame físico e comportamental**

O extrato nebulizado de cascas de *X. americana* L. não indicou qualquer manifestação de toxicidade ou dano a saúde dos animais tratados, para as diferentes concentrações e períodos testados. Não foram observadas alterações no tônus muscular, na frequência respiratória, excitação, hipnose, convulsão, salivação, pilo-ereção, lacrimejamento, diarreia e contorções abdominais. Os animais mantiveram suas atividades de locomoção e socialização dentro da normalidade.

### 3.2. Letalidade

Não houve mortes entre os indivíduos do ensaio de toxicidade aguda. No ensaio de toxicidade subaguda, houve morte de um indivíduo, para a concentração de 350 mg/kg/dia (Tabela 2).

**Tabela 2:** Toxicidade aguda e subaguda do extrato nebulizado de *Ximenia americana* L. em camundongos *Mus musculus*

Ensaio	Concentrações	Letalidade
<b>Toxicidade Aguda</b>	CN	0/5
	50 mg/kg	0/5
	250 mg/kg	0/5
	500 mg/kg	0/5
	2000 mg/kg	0/5
<b>Toxicidade Subaguda</b>	CN	0/5
	150 mg/kg/dia	0/5
	250 mg/kg/dia	0/5
	350 mg/kg/dia	1/5

CN: Controle Negativo.

### 3.3. Consumo de água e ração

Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas, quanto ao consumo de água e ração dos animais dos grupos tratados com o extrato nebulizado de *X. americana* L., quando comparados ao do grupo CN (Tabela 3).

**Tabela 3:** Consumo de água e ração dos camundongos tratados com extrato nebulizado de *Ximenia americana* L. e dos camundongos do controle negativo

Ensaio	Concentrações	Consumo de Água	Consumo de Ração
<b>Toxicidade Aguda</b>	CN	77±14,8	70,6±8,19
	50 mg/kg	77±6,70	73,5±9,19
	250 mg/kg	75±7,90	74,6±4,41
	500 mg/kg	76±6,50	77,6±7,15
	2000 mg/kg	76±6,50	69,3±7,17
<b>Toxicidade Subaguda</b>	CN	86±23,2	74,1±11,4
	150 mg/kg/dia	80±11,9	70,4±11,3
	250 mg/kg/dia	93±16,0	75,8±12,4
	350 mg/kg/dia	85±16,0	67,7±6,36

CN: Controle Negativo; Valores expressos em média±desvio padrão da média, consumo de água (mL), consumo de ração (g).

Na avaliação do peso corpóreo dos animais dos grupos tratados com o extrato nebulizado de cascas de *X. americana* L., não foi observada diferença estatisticamente significativa, quando comparado com os indivíduos do CN, como mostra a tabela 4. No ensaio de toxicidade aguda, o peso corpóreo dos animais variou de  $29,7 \pm 0,45$  à  $30,4 \pm 1,20$ , o peso final variou de  $30,2 \pm 1,71$  à  $31,5 \pm 1,51$  e o ganho de peso variou de  $0,46 \pm 1,68$  à  $1,26 \pm 1,13$ . No ensaio de toxicidade subaguda, o peso inicial variou de  $25,6 \pm 1,23$  à  $28 \pm 1,36$ , o peso final variou de  $26,8 \pm 2,11$  à  $30,4 \pm 1,79$  e o ganho de peso variou de  $0,32 \pm 2,78$  à  $2,40 \pm 0,66$  (Tabela 4).

### **3.5. Avaliação macroscópica e peso relativo dos órgãos**

Na avaliação macroscópica dos órgãos dos animais expostos às diferentes concentrações do extrato nebulizado de *X. americana* L., não foram observadas quaisquer alterações na morfologia geral do órgão, ou na sua coloração, quando comparado ao grupo CN. No ensaio de toxicidade aguda, foi observado que o peso relativo dos órgãos dos animais tratados com *X. americana* L. apresentou uma diminuição estatisticamente significativa, quando comparados aos resultados do CN. Foi observada uma diminuição do peso do coração, para as concentrações de 50, 250 mg/kg; fígado, para a concentração de 250 mg/kg; pâncreas, para as concentrações de 250, 500 e 2000 mg/kg, sendo que na concentração mais alta (2000 mg/kg) este órgão apresentou uma redução no peso 3 vezes maior que a observada na menor concentração (50mg/kg); pulmão, para a concentração de 250 mg/kg; rins, para as concentrações de 50 e 250 mg/kg; testículos, para todas as concentrações (50, 250, 500 e 2000 mg/kg) e tireoide, para as concentrações de 500 e 2000 mg/kg. Já no ensaio de toxicidade subaguda, não houve diferenças estatisticamente significativas observadas entre o peso relativo dos órgãos dos grupos tratados quando comparados ao do CN (Tabela 5).

**Tabela 4:** Efeitos das diferentes concentrações do extrato nebulizado de *Ximenia americana* L.no peso corporal dos camundongos *Mus musculus*, durante o período experimental

Ensaio	Tratamentos	Peso Inicial/Animal					Peso Final/Animal					Ganho de Peso
		A1	A2	A3	A4	A5	A1	A2	A3	A4	A5	Média±DP
<b>Toxicidade Aguda</b>	CN	30,00	31,00	30,00	30,00	30,00	30,40	33,00	30,40	30,80	30,70	0,86±0,66
	50 mg/kg	30,50	31,20	28,30	31,00	31,00	30,50	32,90	29,20	31,00	31,40	0,60±0,72
	250 mg/kg	30,00	30,20	31,00	29,20	31,00	32,90	30,90	31,70	29,30	32,90	1,26±1,13
	500 mg/kg	30,00	30,00	31,00	28,80	30,40	30,40	30,50	32,00	29,60	32,80	1,02±0,81
	2000 mg/kg	30,00	29,00	29,50	30,00	30,00	33,00	29,50	30,30	28,50	29,50	0,46±1,68
<b>Toxicidade Subaguda</b>	CN	25,70	24,00	25,60	27,00	28,70	27,30	24,30	26,50	29,40	29,90	1,30±0,91
	150 mg/kg/dia	26,70	29,00	24,00	27,80	27,70	27,30	29,60	26,70	26,00	26,00	0,53±1,84
	250 mg/kg/dia	28,10	26,50	29,80	27,80	26,30	30,60	28,00	32,30	30,90	26,60	2,40±0,66
	350 mg/kg/dia	25,20	27,10	28,00	29,80	29,70	29,00	27,40	28,20	26,80	-	0,32±2,78

CN: Controle Negativo; A: Animal; - : morte do indivíduo; Peso inicial e final de cada animal expressos em gramas; Ganho de peso expresso em gramas, média±desvio padrão da média.

**Tabela 5:** Efeito das diferentes concentrações do extrato nebulizado de *Ximenia americana* L.no peso relativo de órgãos dos animais, após o período de experimentação

Ensaio	Tratamentos	Baço	Coração	Fígado	Pâncreas	Pulmões	Rins	Testículo	Tireóide
<b>Toxicidade Aguda</b>	CN	0,002±0,0010	0,005±0,0010	0,039±0,0030	0,005±0,0010	0,007±0,0010	0,015±0,0020	0,007±0,0005	0,008±0,0010
	50 mg/kg	0,002±0,0003	0,004±0,0010	0,034±0,0050	0,004±0,0010	0,006±0,0010	<b>0,012±0,0010*</b>	<b>0,006±0,0004*</b>	0,006±0,0006
	250 mg/kg	0,002±0,0003	<b>0,003±0,0010*</b>	<b>0,030±0,0030*</b>	<b>0,003±0,0010*</b>	<b>0,005±0,0010*</b>	<b>0,010±0,0010*</b>	<b>0,006±0,0004*</b>	0,006±0,0008
	500 mg/kg	0,005±0,0010	<b>0,004±0,0010*</b>	0,033±0,0030	<b>0,003±0,0010*</b>	0,006±0,0010	0,013±0,0010	<b>0,006±0,0003*</b>	<b>0,006±0,0009*</b>
	2000 mg/kg	0,002±0,0010	0,005±0,0010	0,038±0,0030	<b>0,003±0,0010*</b>	0,007±0,0010	0,014±0,0010	<b>0,006±0,0009*</b>	<b>0,006±0,0020*</b>
<b>Toxicidade Subaguda</b>	CN	0,002±0,0000	0,004±0,0000	0,030±0,0100	0,003±0,0000	0,006±0,0000	0,010±0,0010	0,006±0,0010	0,006±0,0020
	150 mg/kg/dia	0,002±0,0010	0,004±0,0010	0,030±0,0040	0,004±0,0010	0,008±0,0000	0,010±0,0000	0,007±0,0010	0,007±0,0010
	250 mg/kg/dia	0,002±0,0000	0,004±0,0000	0,030±0,0000	0,003±0,0000	0,005±0,0010	0,010±0,0010	0,006±0,0000	0,005±0,0100
	350 mg/kg/dia	0,002±0,0000	0,004±0,0000	0,030±0,0000	0,002±0,0000	0,006±0,0000	0,010±0,0000	0,006±0,0000	0,007±0,0100

CN: Controle Negativo; Valores médios ± desvio padrão da média representados em gramas, \*: significativo quando comparados ao CN (p<0,05 - ANOVA/Dunnet).

### 3.6. Avaliação do efeito citotóxico e mutagênico do extrato nebulizado de cascas de *X. americana* L. em eritrócitos da medula óssea de camundongo *Mus musculus*

A análise da citotoxicidade foi determinada pela relação entre PCE/NCE. Os resultados desta análise mostraram que o extrato nebulizado de *X. americana* L. não apresentou potencial citotóxico, para o ensaio de toxicidade subaguda. O potencial mutagênico do extrato nebulizado de *X. americana* L. foi avaliado pela análise de MN em eritrócitos policromáticos (MNPCE) de camundongos *Mus musculus*. Não houve um aumento estatisticamente significativo de MNPCE nas concentrações avaliadas no ensaio de toxicidade subaguda (Tabela 6).

**Tabela 6:** Avaliação do efeito citotóxico e mutagênico do extrato nebulizado de *Ximenia americana* L. em eritrócitos da medula óssea de camundongos *Mus musculus*

Ensaio	Concentrações	N° de MNPCE/animal					MNPCE Média±DP	PCE/NCE Média±DP
		A1	A2	A3	A4	A5		
	CN	3	1	5	3	2	2,8±1,48	1,43±0,31
Toxicidade Subaguda	150 mg/kg/dia	8	17	2	9	4	8,0±5,78	1,63±0,80
	250 mg/kg/dia	3	1	0	1	4	1,8±1,64	1,54±0,54
	350 mg/kg/dia	12	9	6	1	-	7,0±4,69	1,32±0,20

CN: Controle Negativo; A: animal; MNPCE: Eritrócito Policromático Micronucleado;-: Morte do animal.

## 4. Discussão e Conclusão

O uso de plantas medicinais é, muitas das vezes, estimulado pelo seu baixo custo, associada à convicção de que extratos naturais não promovem efeitos colaterais no organismo (SOUZA, 2017). No entanto, os extratos vegetais podem provocar efeitos adversos graves à saúde, apresentando assim contraindicações para o seu uso. Por esta razão, esses compostos necessitam passar por avaliações que comprovem a sua qualidade e segurança e também estabeleçam padrões de tratamento para seu uso seguro (MAGALHÃES, 2015). O emprego da medicina popular, com base em conhecimento empírico, não é suficiente para validar as plantas medicinais como medicamentos seguros e eficazes. Farias (2007) afirma que as plantas medicinais devem ser avaliadas, quanto a sua relação risco/benefício, por meio de estudos farmacodinâmicos e toxicológicos. Estudos de toxicidade aguda e subaguda fazem parte da primeira bateria de testes realizados em avaliações pré-clínicas de um produto natural para consumo humano. O desconhecimento, por parte da população, sobre possíveis efeitos secundários e tóxicos dos extratos vegetais, pode proporcionar graves consequências para a saúde humana em curto e em longo prazo (NAVARRO-MOL, 2000).

O presente estudo avaliou a toxicidade aguda e a toxicidade subaguda com possíveis efeitos citotóxicos e mutagênicos do extrato nebulizado de *X. americana* L., administrado por via oral em camundongos *Mus musculus*. Na avaliação da toxicidade aguda, não houve letalidade dos indivíduos, até mesmo para a maior concentração estudada (2000 mg/kg), logo o extrato nebulizado de *X. americana* L. pode ser considerado de baixa toxicidade, se enquadrando na Classe 5 das substâncias com DL50 superior a 2000 mg/kg, segundo o guia OECD 423/2001. Esse resultado corrobora com os estudos de toxicidade aguda realizados por Aragão et al. (2018), que testaram este mesmo extrato, avaliado no presente estudo, em ratos Wistar. Esses autores observaram que a concentração de 2000 mg/kg também não induziu morte de nenhum organismo tratado; por Agyigra et al. (2017), que avaliaram a toxicidade aguda de extrato metanólico de cascas do caule de *X. americana* L. e não observaram morte nem para a mais alta concentração estudada (5000 mg/kg); e por Maikai et al. (2008), que avaliaram extrato aquoso das cascas do caule de *X. americana*, também em camundongos *Mus musculus*, e não observaram morte de indivíduos nem para as altas concentrações estudadas deste extrato (2000 e 5000 mg/kg).

Como não foi observado nenhum efeito tóxico na exposição aguda, foi realizada uma avaliação adicional, para avaliar a toxicidade subaguda do extrato nebulizado de *X. americana* L., sobre o organismo teste *Mus musculus*. Para essa análise, foram escolhidas três concentrações (150, 250 e 350 mg/kg/dia). A maior concentração testada (350 mg/kg/dia, administração por 28 dias) induziu a morte de um indivíduo, o que alerta sobre um possível risco de uso subagudo desse extrato, já que na maior concentração 2000 mg/kg, no ensaio agudo (1 dia de administração e 15 dias de observação), não foi registrada morte de nenhum indivíduo. Isto deve-se ao fato de que o teste de toxicidade oral aguda (OECD 423/2001) não se destina a calcular, com precisão, o DL50% de uma substância, mas sim classificar a substância de acordo com as classes de toxicidade definidas por valores de corte de DL50 fixos. A extrapolação de resultados de estudos realizados com animais para a espécie humana, que tem por base o processo de avaliação de risco, tem sido usada para estabelecer níveis de exposição seguros de humanos a produtos químicos (IPCS, 2009).

Nos dois ensaios de toxicidade (aguda e subaguda) não foram observadas diferenças significativas de ganho de peso entre os grupos tratados com *X. americana* L. e o grupo CN. Os sinais de toxicidade sistêmica são definidos a partir da redução da massa corporal dos animais experimentais (TOFOVIC e JACKSON, 1999; RAZA et al., 2002; TEO et al., 2002). Também pode se manifestar pela redução nos consumos de água e ração, alterações de comportamento (apatia) e má condição da pelagem, como a presença de pelos arrepiados

(MELO, 2001). Neste estudo, não foi observado qualquer alteração comportamental nos animais submetidos aos tratamentos agudos e subagudos com o extrato nebulizado, tampouco diferenças significativas no consumo de água e ração por esses animais.

Na avaliação macroscópica dos órgãos dos ensaios de toxicidade aguda, não foi observada nenhuma alteração na coloração e no aspecto morfológico dos mesmos, mas foi observado que o extrato nebulizado de *X. americana* L. diminuiu, estatisticamente, o peso relativo de órgãos como o coração, o fígado, o pâncreas, os pulmões, os rins, os testículos e a tireoide. Já para o ensaio de toxicidade subaguda, não foram registradas alterações estatisticamente significativa para o peso dos órgãos, tampouco para os aspectos morfológicos macroscópicos dos mesmos. As alterações no peso relativo dos órgãos podem indicar toxicidade (GONZALEZ e SILVA, 2003) ou dano ao órgão (MUHAMMAD et al., 2015; OLANIYAN et al., 2016). A diminuição dos órgãos pode estar ligada a presença de constituintes químicos no extrato da planta, tais como os que podem ter um efeito positivo ou negativo em um animal. A diminuição dos testículos também foi observada por Abubakar e Salka (2011), onde os autores observaram efeito adverso no sistema reprodutor masculino de ratos Wistar tratados com extratos de diferentes partes da *X. americana* L. (raízes, folhas, e cascas do caule), por 15 dias. O estudo mostrou uma diminuição do comportamento sexual, danos espermáticos e perda de peso testicular dose dependente, cujos danos mais evidentes foram aqueles provocados pelo extrato de raízes da planta. Os autores ainda sugerem que esta diminuição dos testículos pode estar relacionada à presença de pró-oxidantes nos extratos, como flavonoides, saponinas, antraquinonas, alcaloides e terpenoides, substâncias estas que, quando em altas concentrações, podem induzir danos oxidativos, devido a ação dos radicais livres e a formação de espécies reativas de oxigênio.

Análises fitoquímicas realizadas com o extrato nebulizado das cascas do caule de *X. americana* L., por Santana et al. (2018), registraram a presença de polifenóis, taninos e flavonoides tais como, ácido gálico, catequina e quercetina. Estudo realizado por Maikai et al. (2008), com extrato aquoso da casca do caule de *X. americana* L., detectou altos teores de glicosídeos cardiotônicos, taninos, alcaloides, antraquinonas, flavonoides, saponinas e terpenoides no extrato. O autor cita que estes compostos têm efeitos pró-oxidantes e antioxidantes no organismo, que, enquanto o antioxidante protege os tecidos e órgãos, o pró-oxidante danifica os tecidos e órgãos.

A avaliação de citotoxicidade do extrato nebulizado de *X. americana* L., realizada nos ensaios de toxicidade subaguda, foi obtida pela relação entre PCEs e NCEs. Os resultados deste estudo mostraram que o extrato nebulizado não apresentou potencial citotóxico para



eritrócitos do organismo teste *Mus musculus*. A citotoxicidade de plantas medicinais deve ser considerada um problema de saúde pública, pois seus efeitos adversos, podem causar sérios riscos à saúde. Um problema que pode prejudicar a saúde de um consumidor de plantas medicinais é a interação possível entre os compostos presentes na planta com outras drogas utilizadas pelo paciente (VEIGA JUNIOR et al., 2005). Sabe-se que muitas plantas medicinais utilizadas pela população não são suficientemente estudadas, quanto à presença de substâncias citotóxicas, o que pode colocar em risco a saúde do seu consumidor (BAGANTINI et al., 2007). Compostos citotóxicos, dependendo do nível de toxicidade, podem ocasionar danos no DNA (KIRSCH-VOLDERS et al. 2004).

A avaliação da presença de MN em ensaio de toxicidade subaguda, realizado com o extrato nebulizado de *X. americana* L., não mostrou potencial mutagênico para as concentrações avaliadas. Estudo do potencial mutagênico de extratos vegetais é de fundamental importância para a produção de novos produtos com potencial terapêutico, também servindo como um parâmetro de segurança para o uso de determinados produtos (PERON et al. 2008).

Danos no DNA, promovidos por substâncias mutagênicas, podem ser corrigidos pelos mecanismos de reparo das células ou então fixados no DNA, transformando uma célula normal em uma célula tumoral. Quando isso acontece, essa célula mutada pode se reproduzir descontroladamente e adquirir um comportamento invasivo em outros tecidos (ALMEIDA NETO et al. 2005; FIGUEIREDO, 2012). Isto pode se dar em resposta a exposição da célula a vários agentes físicos ou químicos, como os fitoquímicos. Esses compostos são agentes xenobióticos que podem agir, diretamente ou indiretamente sob um sistema orgânico, ou podem ainda sofrer transformações, tornando-os potencialmente tóxicos (LAPA et al. 1999). Apesar do avanço atual das pesquisas nas áreas da farmacologia, o consumo de substâncias derivadas de plantas deve ser monitorado, por meio de ensaios que detectem efeitos tóxicos e toxicogênicos de tais substâncias, com intuito de alertar as pessoas sobre os possíveis riscos para o seu bem-estar (BAGATINI et al. 2007).

O uso tradicional de qualquer planta para fins medicinais, de modo algum, garante a sua segurança de consumo. A falta de dados de toxicidade de muitas plantas medicinais faz com que seu uso possa não ser totalmente seguro (SIMÕES et al. 2003; EL HILALY et al., 2004; ITO et al., 2014). Portanto, fica o alerta de que plantas medicinais podem também apresentar efeitos tóxicos (PING et al., 2013) e que o consumo de derivados de plantas pode também caracterizar um risco à saúde do consumidor.

## 5. Referências Bibliográficas

ABUBAKAR, A. A., SALKA, M. N., Effects of methanol extract of *Ximenia americana* on sexual behaviour, testicular weight, sperm count and sperm morphology of wister rats., *Annals of Biological Research*, v.2 , n.1, p.107-113, 2011.

AGYIGRA, I. A., EJIOFOR, J. I., MAGAJI, M. G., Acute and subchronic toxicity evaluation of methanol stem-bark extract of *Ximenia americana* Linn. (Olacaceae) in Wistar rats. *Bull. Fac. Pharm. Cairo Univ.* v.55, p.263-267, 2017.

ALMEIDA, M. L. B., FREITAS, W. E. S., MORAIS, P. L. D., SARMENTO, J. D. A., ALVES, R. E., Bioactive compounds and antioxidant potential fruit of *Ximenia americana* L. *Food Chem.* v.192, 1078-1082, 2016.

ALMEIDA NETO, X. J., MEDEIRO, F. P. M., MELO, A. J. M., SILVA, J. C., DANTAS, J. P., Avaliação do efeito mutagênico da palma forrageira (*Opuntia fícus-indica* Mill) através do teste do micronúcleo em medula óssea de ratos (*Rattus norvegicus*, Linhagem Wistar) in vivo. *Revista de Biologia e Ciência da Terra*, v.5, n.2, p. 1-11, 2005.

ALVES, R. R. N., Utilização e comércio de plantas medicinais em Campina Grande, PB, Brasil., *Electronic Journal of Pharmacy*, v.4, n.2, 2007.

ARAGÃO, T. P., PRAZERES, L. D. K. T., BRITO, S. A., NETO, P. J. R., ROLIM, L. A., ALMEIDA, J. R. G. S., CALDAS, G. F. R., WANDERLEY, A. G., Contribution of Secondary Metabolites to the Gastroprotective Effect of Aqueous Extract of *Ximenia americana* L. (Olacaceae) Stem Bark in Rats, *Molecules*, v.23, n.112, 2018.

ARAÚJO, M. R. S., MONTE, F. J., BRAZ-FILHO, R. A., New sesquiterpene form *Ximenia americana* Linn. *Helvetica chimica Acta*, v. 92, n.1, p. 127-132, 2009.

ASIIMWE, S., KAMATENESI-MUGISHA, M., NAMUTEBI, A., BORG-KARLSSON, A.K., MUSIIMENTA, P., Ethnobotanical study of nutri-medicinal plants used for the management of HIV/AIDS opportunistic ailments among the local communities of western Uganda. *J. Ethnopharmacol.* v.150, 639-648, 2013.

ASRES, K., BUCAR, F., DE CLERCQ, E., KARTNIG, T., PANNECOUQUE, C., Antiviral activity against human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) and type 2 (HIV-2) of ethnobotanically selected ethiopian medicinal plants. *Phytother R* v.15, p. 62-69, 2001.

BAGATINI, M. D., SILVA, A. C. F. TEDESCO, S. B., Uso do sistema teste de *Allium cepa* como bioindicador de genotoxicidade de infusões de plantas medicinais. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 17, n. 3, p. 444-447, 2007.

BENOIT, F., VALENTIN, A., PELISSIER, Y., DIAFOUKA, F., MARION, C., *In vitro* antimalarial activity of vegetal extracts used in West African traditional medicine. *Am J Trop Med Hyg* v.54, p.67-71, 1996.

BURKILL, H., Royal Botanic gardens. Surrey v.4 p.264-266, 1997.

BRASILEIRO, M. T., EGITO, A. A., LIMA, J. R., RANDAU, G. C. P., ROLIM NETO, P. J., *Ximênia americana* L: Baotânica, química e farmacologia no interesse da tecnologia farmacêutica. Ver. Bras. Farm. n.89, v.2, p.164-167, 2008.

CARTAXO, S. L., SOUZA, M. M. A., ALBUQUERQUE, U. P., Medicinal plants with bioprospecting potential used in semi-arid northeastern Brazil. Journal of ethnopharmacology, v.131, n.2, p. 326-342, 2010.

CHENG, H., YUEBO, Z., ZHENWEI, G., SHENG, X., LI, Z., WEI, Z., QIN, Y., Berberine inhibits 3T3-L1 adipocyte differentiation through the PPAR $\gamma$  pathway. Biochem. Biophys. Res. Commun, v.348, p.571-578, 2006.

COUTO, R. O. Obtenção e caracterização do extrato seco padronizado da *Rosmarinus officinalis* L. (LAMIACEAE) (2011). Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Goiás, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Fármacos e Medicamentos, 128p.

EL HILALY, J., ISRAILI, Z. H., LYOUSSI, B., Acute and chronic toxicological studies of *Ajuga reptans* in experimental animals. J. Ethnopharmacol. n.91 v.1, p. 43-50, 2004.

EROMOSELE, C. O., EROMOSELE, I. C., Fatty acid compositions of seed oils of *Haematosiphis barteri* and *Ximènia americana*. Bioresource Technology. v.82, n.3, p. 303-304, 2002.

FARIAS, E. M. F. G. Avaliação da toxicidade aguda do extrato metanólico de folhas de *Lippia sidoides* Cham. (Verbenaceae) In: CONGRESSO BRASILEIRO DE QUÍMICA. Sociedade Brasileira de Química, Natal, 2007.

FEYSSA, D. H., NJOK, J. T., ASFAW, Z., Uses and management of *Ximènia americana*, olacaceae in semi-arido east Shewa, Ethiopia. Parkistan Journal of Botany, v.44, n. 4, p.1177-1184, 2012.

FIGUEIREDO, F. R. G., Ensaios mutagênicos em decocto de *Cochlospermum regium* (Mart. et. Schr.) Pilger (Bixaceae) em *Poecilia reticulata* e linfócitos humanos (2012). Dissertação de Mestrado em Ciências Ambientais e Saúde, Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Goiânia, 115p.

FRANCO, E. A. P., BARROS, R. F. M., Uso e diversidade de plantas medicinais no Quilombo Olho D água dos Pires, Esperantina, Piauí. Rev Bras Plant Med n.8, p.78 – 88, 2006.

GEORGE, P. Concerns regarding the safety and toxicity of medicinal plants – An overview. Journal Applied Pharmaceutical Science, v. 1, n.6, p. 40-44, 2011.

GONZÁLEZ, F. H. D., SILVA, S. C., Introdução à Bioquímica Clínica Veterinária. Porto Alegre: UFRGS, p.179-198, 2003.

GRONHAUG, T. E., GLÆSERUD, S., SKOGSRUD, M., BALLO, N., BAH, S., DIALLO, D., PAULSEN, B. S., Ethnopharmacological survey of six medicinal plants from Mali, West-Africa. *J. Ethnobiol. Ethnomed.* n.26, v.4, p.1-11, 2008.

HAQ, I. Safety of plants medicinal. *Pakistan Journal of Medical Research*, v. 43, n.4, p. 1-8, 2004.

International Program on Chemical Safety. (I.P.C.S., 2009). Principles and Methods for the Risk Assessment of Chemicals in Food. Chapter 5. Dose-response assessment and derivation of health-based guidance values. Environmental Health Criteria. Disponível em: [http://whqlibdoc.who.int/ehc/WHO\\_EHC\\_240\\_8\\_eng\\_Chapter5.pdf](http://whqlibdoc.who.int/ehc/WHO_EHC_240_8_eng_Chapter5.pdf). Acesso em Julho de 2018.

ITO, T., ONO, T., SATO, A., GOTO, K., MIURA, T., WAKAME, K., NISHIOKA, H., MAEDA, T., Toxicological assessment of enzyme-treated asparagus extract in rat acute and subchronic oral toxicity studies and genotoxicity tests. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* n.68, v.2, p.240-249, 2014.

JAMES, D. B., ABU, E. A., WUROCHEKKE, A. U., ORGI, G. N. Phitochemical and Antimicrobial investigation of the aqueous and methanolic extracts of *Ximenia americana*. *Journal of Medical Science, Zaria*, n.7, v. 2, p. 284-288, 2007.

JAMES, D. B., OWOLABI, A. O., IBIYEYE, H., MAGAJI, J., IKUGIYI, Y. A., Assessment of the hepatic effects, hematological effect and some phytochemical constituents of *Ximenia americana* (Leaves, stem and root) extracts, *African Journal of Biotechnology*, v. 7, n. 23, 2008.

KABRAN, G. R., AMBEU, N. C., MAMYRBÉKOVA-BÉKRO, J. A., BÉKRO, Y. A., Phenols and Total Flavonoids in Organic Extracts of Ten Plants Used in Breast Cancer Tradithapia in Côte d'Ivoire. *Eur J Sci Res.* n.68, p.182-190, 2012.

KIRSCH-VOLDERS, M., SOFUNI, T., AARDEMA, M., ALBERTINI, S., EASTMOND, D., FENECH, M., ISHIDATE JR. M., KIRCHNER, S., LORGE, E., MORITA, T., NORPPA, H., SURRALLÉS, J., VANHAUWAERT, A., WAKATA, A. Report from the in vitro micronucleus assay working group. *Mutat. Res.*, v.540, p.153-163, 2003.

LAPA, A. J., SOUCCAR, C., LIMA-LANDMAN, M. T. R., GODINHO, R. O., NOGUEIRA, T. C. M. L. Farmacologia e toxicologia de produtos naturais. IN SIMÕES., C. M. O., SCHENKEL, E. P., GOSMANN, G., MELLO, J. C. P., MENTZ, L. A., PETROVICK, P. R (org). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5.ed. Porto Alegre: Ed. Universidade/UFRGS, 2004.

LE, N. H. T., MALTERUDA, K. E., DIALLOB, D., PAULSENA, B. S., NERGÅRDA, C. S., WANGENSTEEN, H. Bioactive polyphenols in *Ximenia americana* and the traditional use among Malian healers. *J. Ethnopharmacol.* n.139, v.3, p.858-862, 2012.

LORENZI, H., MATOS, F. J. A., *Plantas Medicinais No Brasil: Nativas e Exóticas*, 2nd ed.; Instituto Plantarum: Nova Odessa, São Paulo, Brasil, p. 399-400 2008.

- MAGALHÃES, L. S., PUSSENTE, C. G., AZEVEDO, L. R., CRESPO, J. M. R. S., Avaliação da atividade antibacteriana do extrato de *Caesalpinia ferrea* Martius e desenvolvimento de uma formulação fitocosmética. *Revista Científica da Faminas*, v. 11, n. 1, 2015.
- MAIKAI, V. A., *Kobo, P.I., Adaud, A.O.*, Acute toxicity studies of aqueous stem bark extract of *Ximenia americana.*, *African Journal of Biotechnology*, v. 7, n.10, 2008.
- MAISTRO, E. L. The in vivo rodent micronucleus test. L.M. Sierra, I. Gaivão (Eds.), *Genotoxicity and DNA Repair: a Practical Approach, Methods in Pharmacology and Toxicology*, Springer Science+Business Media, New York, p. 103-113, 2014.
- MATOS, F. J. A., *Plantas medicinais: guia de seleção e emprego das plantas usadas em fitoterapia no nordeste do Brasil* Fortaleza: Imprensa Universitaria, 2007.
- MELLO, F. B., Estudo dos efeitos de *Lantana câmara* (Verbenaceae) sobre a fertilidade e reprodução de ratos. (2001). Dissertação de Mestrado em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 120p.
- MELO, J. G. et al. Medicinal plants used as antitumor agents in Brazil: an ethnobotanical approach. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, v. 2011, p. 365-359, 2011.
- MORAIS-COSTA, F., SOARES, A. C. M., BASTOS, G. A., NUNES, Y. R. F., GERASEEV, L. C., BRAGA, F. C., LIMA, W. D., DUARTE, E. R., Plants of the Cerrado naturally selected by grazing sheep may have potential for inhibiting development of *Haemonchus contortus* larva. *Trop. Anim. Health Prod.* n.47, p.1321-1328, 2015.
- NAVARRO-MOLL, M. C. *Uso racional de las plantas medicinales.* Pharmaceutical Care, Barcelona, v. 2, p. 9-19, 2000.
- OGUNLEYE, D. S., IBITOYE., TROP, S. F., Studies of antimicrobial activity and chemical constituents of *Ximenia americana*. *Journal of Phammaceutical Research*, v. 2, n. 2, p. 239-241, 2003.
- OLABISSI, O. A., MOUSSA, O., MOUSTAPHA, O., EDGARD, Z. F., ELÉONORE, K., MARIUS, L., PIERRE, G.I., Acute toxicity and anti-inflammatory activity of aqueous ethanol extract of root bark of *Ximenia americana* L. (Olacaceae). *African J. Pharm. Pharmacol* v.5, p.806-811, 2011.
- OLANIYAN, M. F., BABATUNDE, E. M., Preventive (myoglobin, transferrin) and scavenging (superoxide dismutase, glutathione peroxidase) antioxidative properties of raw liquid extract of *Morinda lucida* leaf in the traditional treatment of Plasmodium infection. *Journal of Natural Science, Biology and Medicine.* n.7, v.1p. 47-53.
- OMER, M. E. F. A., ELNIMA, E. I., Antimicrobial activiy of *Ximenia americana*. *Fitoterapia*, v. 74, p. 122-126, 2003.

Organization for economic cooperation and development (OECD), 2001. Guideline 423. Acute oral toxicity- acute toxic class method. 470 adopted by the council on 17th, december 2001.

Organization for economic cooperation and development (OECD), 1995. Guideline 407. Repeated-dose 28-day oral toxicity study in rodents. 468 adopted by the council on 27th, july 1995.

PANTOJA, P. S., ASSREUYB, A. M. S., SILVA, R. O., DAMASCENO, S. R. B., MENDONÇA, V. A., MENDES, T. S., MORAIS, J. A. V., ALMEIDA, S. L., TEIXEIRA, A. E. E. A., SOUZA, M. H. L. P., PEREIRA, M. G., SOARES, P. M. G., The polysaccharide-rich tea of *Ximenia americana* barks prevents indomethacin-induced gastrointestinal damage via neutrophil inhibition, *Journal of Ethnopharmacology*, p.195-201, 2018.

PARK, M, Y. et al., 28 days repeated oral dose toxicity tests of aqueous extracts of mahawangyoungpae-tang, a polyherbal formula. *Food and Chemical Toxicology*, v. 48, p.2477-2482, 2010.

PERON, A. P., FELIPES, L., MATTAGE, G. I., CANTAGALLI, L. B., MAURIUCCI, R. G., VICENTINI, V. E. P., Avaliação mutagênica das plantas medicinais *Baccharis trimera* Less. e *Solanum melongena* L. em células de medula óssea de ratos Wistar. *Revista Brasileira de Biociências*, Porto Alegre, v. 6, n.2, p.127-130, 2008.

PING K. Y., DARAH, I., CHEN, Y., SREERAMANAN, S., SASIDHARAN, S., Acute and Subchronic Toxicity Study of *Euphorbia hirta* L. Methanol Extract in Rats, 2013.

QUINTANS JUNIOR, L. J., ALMEIDA, R. N., FALCO, A. C. G. M., AGRA, M. F., SOUSA, M. F. V., BARBOSA FILHO, J. M., Avaliação da Atividade Anticonvulsivante de Plantas do Nordeste Brasileiro. *Acta Farm. Bonaerense*. v.21, p. 179-184, 2002.

RAZA, M., AL-SHABANAH, A. O., EL-HADIYAH, T. M., AL-MAJED, A. A., Effect of prolonged vigabatrin treatment on haematological and biochemical parameters in plasma, liver and kidney of Swiss albino mice. *Sci PharM*. n. 70, p.135-145, 2002.

REYES-GARCÍA, V., The relevance of traditional knowledge systems for ethnopharmacological research: theoretical and methodological contributions. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, v.6, p.32, 2010.

RIBEIRO, L. R., SALVADORI, D. M. F., MARQUES, E. K., *Mutagênese Ambiental*. 1 ed. Brasil: ULBRA, p. 355, 2003.

ROQUE, A. A., ROCHA, R. M., LOIOLA, M. I. B., Uso e diversidade de plantas medicinais da Caatinga na comunidade rural de Laginhas, município de Caicó, Rio Grande do Norte (nordeste do Brasil), *Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu*, v.12, n.1, p.31-42, 2010.

SACANDE, M., VAUTIER, H., *Ximenia americana* L. *Forest e Landse Denm*. n.112, p.1-2, 2006.

SANTANA, C. P., MEDEIROS, F. D., CORREIA, L. P. DINIZ, P.H. G. D., VEÂRAS, G., MEDEIROS, A. C. D., Dissolution and uniformity of content of tablets developed with extract of *Ximenia americana* L., PLoS ONE, v.13, n.5, 2018.

SARMENTO, J. D. A., MORAIS, P. L. D., SOUZA, F. I., MIRANDA, M. R. A., Physical-chemical characteristics and antioxidant potential of seed and pulp of *Ximenia americana* L. from the semiarid region of Brazil. African Journal of Biotechnology, n.4, v.20, p.1743-1752, 2015.

SCHMID, W. The micronucleus test. Mutat. Res., v. 31, p. 9-15, 1975.

SHETTAR, A. K., KOTRESHA, K., KALIWAL, B. B., VEDAMURTHY, A. B., Evaluation of in vitro antioxidant and anti-inflammatory activities of *Ximenia americana* extracts. Asian Pac. J. Trop. Dis. v.5, p.918-923, 2015.

SHETAR, A. K., SATEESH, M.K., KALIWAL, B.B., VEDAMURTHY SHPITZ, A.B., BOMSTEIN, B., MEKORI, Y., COHEN, Y., KAUFMAN, R., GRANKIN, Z., BERNHEIM, M., In vitro antidiabetic activities and GC-MS phytochemical analysis of *Ximenia americana* extracts J. Proliferating cell nuclear antigen as a marker of cell kinetics in aberrant crypt foci hyperplastic polyps, adenomas, and adenocarcinomas of the human colon. Am. J. Surg, v.174, p.425-430, 2017.

SIDDAIAH, M., JAYAVEERA, K., MALLIKARJUNA, R., RAVINDRA, R., YASODHA, K., Phytochemical screening and analgesic activity of methanolic extract of *Ximenia americana*. J.Pharm.Chem 3: 23-25 2009.

SIMÕES, C. M. O., SCHENKEL, E. P., GOSMANN, G., MELLO, J. C. P., MENTZ, L. A., PETROVICK, P. R., Farmacognosia: da planta ao medicamento, Porto Alegre: UFRGS, 5 ed., 1102 p. 2003.

SILVA, G. G., SOUZA, P. A., MORAIS, P. L. D., SANTOS, E. C., MOURA, R. D., MENEZES, J. B., Caracterização do fruto de ameixa silvestre (*Ximenia americana* L.). Rev. Bras. Frutic. n.30, v.2, p.311-314, 2008.

SILVA-LEITE, K. E. S., GIRÃO, D. K. F. B., PIRES, A. F., ASSREUY, A. M. S., MORAES, P. ALMIR F., CUNHA, A. P. RICARDO, N, M. P. S., CRIDDLE, D. N., SOUZA, M. H. L. P., PEREIRA, M. G. SOARES, P. M. G., *Ximenia americana* heteropolysaccharides ameliorate inflammation and visceral hypernociception in murine caerulein-induced acute pancreatitis: Involvement of CB2 receptors, Biomedicine & Pharmacotherapy. v.106, p.1317-1324, 2018.

SORO, T. Y., TRAORE, F., SAKANDE, J., Activité analgésique de l'extrait aqueux de *Ximenia americana* (Linné) (Olacaceae). C. R. Biol. n.332, p.371-377, 2009.

SOUSA, M. J. B., Avaliação do Potencial Genotóxico e Mutagênico de Extratos Padronizados de *Caesalpinia ferrea* (jucá) e *Brosimum gaudichaudii* (inharé), (2017). Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação Mestrado em Genética - MGene, Pontifícia Universidade Católica de Goiás – PUC Goiás. 91p.

TEO, S., STIRLING, D., THOMAS, S., HOBERMAN, A., KIORPES, A., KHETANI, V., A 90-day oral gavage toxicity study of p-methylphenidate and d,l-methylphenidate in Sprague-Dawley rats. *Toxicology*. n.179, p.183-196, 2002.

TOFOVIC, S. P., JACKSON, E. K., Effects of long-term caffeine consumption on renal function in spontaneously hypertensive heart failure prone rats. *J Cardiovasc Pharmacol* n.33, p.360-366, 1999.

TRAESEL, G. K., DE SOUZA, J. C., DE BARROS, A. L., SOUZA, M. A., SCHMITZ, W. O., MUZZI, R. M., OESTERREICH, S. A., ARENA, A. C., Acute and subacute (28 days) oral toxicity assessment of the oil extracted from *Acrocomia aculeata* pulp in rats. *Food Chem. Toxicol.* n.74, p.320-325, 2014.

TRAORE, M. S., BALDE, M. A., CAMARA, A., BALDE, E. S., DIANE, S., DIALLO, M. S. T., KEITA, A., COS, P., MAES, L., PIETERS, L., The malaria co-infection challenge: An investigation into the antimicrobial activity of selected Guinean medicinal plants. *J. Ethnopharmacol.* n.174, 576-581 2015.

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

VOSS, C., EYOL, E., BERGER, M. R., Identification of potent anticancer activity in *Ximenia americana* aqueous extracts used by African traditional medicine. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 211, p.177-178, 2006.



**Artigo 2: Avaliação da toxicidade crônica, citotoxicidade, mutagenicidade e carcinogenicidade do extrato nebulizado de cascas de *Ximenia americana* L. em camundongos *Mus musculus***

Jaqueline Aparecida de Oliveira Dalavilla<sup>1</sup>, Ana Claudia Dantas de Medeiros<sup>2</sup>, Maria Aparecida Marin-Morales<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>UNESP - Universidade Estadual Paulista, Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Av 24-A, 1515, CEP 13506-900, Rio Claro, São Paulo, Brasil.

<sup>2</sup>UEPB - Universidade Estadual da Paraíba, Departamento de Farmácia, Centro de Ciências Biológicas e da saúde, Rua Baraúnas, 351, CEP 58429-500, Campina Grande, Paraíba, Brasil.

\*Autor correspondente. Tel.: +55 19 3526 4143; fax: +55 19 35360009.  
e-mail: mamm@rc.unesp.br

## **Resumo**

A espécie *Ximenia americana* L. é amplamente utilizada na medicina popular, para diferentes fins terapêuticos, que vão desde uma simples febre até doenças mais graves como o câncer. A literatura traz que o uso medicinal desta planta é eficiente para diversas patologias, dentre elas a malária, HIV, diabetes e câncer. Pelo seu amplo uso terapêutico e pelos estudos que apontam resultados positivos para este material botânico, este trabalho teve por objetivo avaliar os efeitos tóxico, citotóxico, mutagênico e carcinogênico, conferidos pela administração oral crônica do extrato nebulizado das cascas de *X. americana* L. em camundongos *Mus musculus*. Neste estudo a avaliação da toxicidade crônica foi realizada seguindo as diretrizes da OECD 452/2009, e a avaliação de citotoxicidade e mutagenicidade pelas diretrizes OECD 474/2016 nas concentrações de 50, 150, 250 e 350 mg/kg/dia do extrato nebulizado das cascas do caule de de *X. americana* L. Neste estudo não foi encontrado efeitos que indicassem potencial citotóxico e mutagênico na avaliação de citotoxicidade e mutagenicidade em eritrócitos da medula óssea e tampouco efeitos inflamatórios nas criptas que pudessem levar a um efeito carcinogênico de cólon pelo aumento de focos de criptas aberrantes, para os animais tratados

com o extrato nebulizado de cascas do caule de *X. americana*. Esse efeito deve-se aos compostos bioativos, presentes no extrato nebulizado das cascas do caule, tais como flavonoides, taninos, ácido gálico, glicosídeos cardiotônicos, quercetina, antraquinonas. Esses compostos vêm sendo descrito na literatura como de ação anticancerígena para linhagens celulares de câncer colorretal de ratos e linhagens celulares de câncer colorretal de humanos.

**Palavras-chave:** Ameixa-do-Mato; Ameixa-do-Sertão; Olacaceae; Planta medicinal; Micronúcleo; Câncer colorretal.

## 1. Introdução

A espécie *X. americana* L. é uma planta tropical encontrada na África, Índia, Nova Zelândia, América Central e América do Sul (SACANDE e VAUTIER, 2006; FEYSSA et al., 2012; SARMENTO et al., 2015), que tem uma ampla utilização na medicina popular (GRONHAUG et al., 2008; JAMES et al., 2008; LE et al., 2012). No Brasil, essa planta é encontrada, principalmente, na região semiárida do Nordeste, sendo popularmente conhecida como ameixa do mato, ameixa brava, ameixa azeda ou ameixa do sertão (SILVA et al., 2008; ARAÚJO et al., 2009).

Os extratos de *X. americana* são utilizados tradicionalmente na medicina popular para diferentes fins terapêuticos (BURKILL, 1997; OLIVEIRA et al., 2010), como, por exemplo, antimalárico (BENOIT et al., 1996; TRAORÉ et al., 2015; SULEMAN et al., 2018). HIV (ASRES et al., 2001), anticarcinogênico (VOSS et al., 2006; KABRAN et al., 2012; PERVAIZ et al., 2015) e para controle de diabetes (SHETTAR et al 2017).

Apesar do uso de plantas medicinais serem amplamente praticados com a visão de não ser tóxico e, portanto seguro (ASIIMWE et al., 2014), há relatos de que muitas delas podem ser tóxicas e causar efeitos adversos ao organismo (HAQ, 2004; PARK et al., 2010; GEORGE, 2011). De todos os tratamentos a base de plantas, poucos foram testados em ensaios clínicos, quanto à sua eficácia e segurança (CHENG et al., 2009). Os produtos naturais têm sido alvo de muitos estudos que buscam por moléculas bioativas com efetivo potencial terapêutico (TRAESEL et al., 2014), e de análises químicas para possíveis medicamentos fitoterápicos, mas estudos que avaliem os potenciais efeitos toxicogênicos de plantas usadas na medicina popular ainda são muito escassos, embora sejam altamente

importantes para a certificação da comprovação de uso seguro e eficácia da ação do produto utilizado (REYES-GARCIA, 2010; MELO et al., 2011).

O uso de extratos nebulizados de plantas com potencial terapêutico vem sendo muito utilizados na farmacologia, pela sua segurança e preservação dos compostos químicos presentes, devido ao processo de produção dos mesmos ser muito rápido, o que impede que haja conjugação ou transformação dos compostos presentes no composto original. Por essa segurança química que apresentam, os extratos nebulizados também são muito utilizados na produção de fitoterápicos (COUTO, 2011)

Os estudos de toxicidade crônica são realizados para determinar o efeito tóxico, após uma exposição prolongada a doses cumulativas de uma substância em estudo. Esses estudos permitem também, observar o potencial carcinogênico da substância, desde que a dose e a via de administração escolhida seja correta para o fim que se destina. Em estudos crônicos, realizados com camundongos, os organismos são submetidos a exposições repetidas, durante um período considerável de sua vida útil. Nestes ensaios podem ser avaliados efeitos relacionados ao desenvolvimento corpóreo e dos órgãos dos animais, além de fornecer uma estimativa do nível de efeito adverso, não observado na toxicidade aguda e subaguda, que pode ser utilizado para estabelecer critérios de segurança para a exposição humana (OECD 452/2009).

Considerando que a espécie *X. americana* L. é muito usada na medicina popular e as comprovações científicas de efeito terapêutico de extratos dessa planta, este estudo avaliou os efeitos do extrato nebulizado das cascas do caule de *X. americana* L. na toxicidade crônica, seus possíveis efeitos citotóxicos e mutagênicos em medula óssea e carcinogênicos de cólon em camundongos *Mus musculus*.

## **2. Material e Métodos**

### **2.1. Material vegetal e preparação do extrato**

O material vegetal foi coletado na região semiárida do Estado da Paraíba, exsiccata da planta está depositada, sob o número de registro EAN-14049, no Herbário Professor Jayme Coelho de Moraes da Universidade Federal da Paraíba. Os experimentos deste estudo foram realizados com extratos nebulizados da casca do caule da *X. americana* L. Para a obtenção do extrato hidroalcoólico as cascas do caule da planta foram secas a 40 °C, pulverizadas em moinho de facas e passadas por processo de maceração a frio em solução etanólica 70%. Para

a obtenção do extrato nebulizado, o extrato hidroalcoólico foi submetido a secagem por aspersão em *spray drying*<sup>®</sup>.

## 2.2. Agentes Químicos

A substância utilizada no grupo controle positivo (CP), para a indução de mutagenicidade, foi a 1,2-dimetilhidrazina (DMH marca Sigma<sup>®</sup>, CAS: n° 306-37-6), concentração de 20mg/kg, diluída em solução de EDTA (0,37mg/ml). A solução foi administrada aos animais pela via intraperitoneal (i.p), na proporção de 0,1ml/10g de peso corpóreo (p.c).

## 2.3. Animais

Foram utilizados, em cada tratamento, 5 camundongos machos da espécie *Mus musculus*, linhagem Swiss, com peso inicial aproximado de 30 gramas. Os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com os princípios éticos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e com a aprovação (Protocolo: 26/2016) do Comitê de Ética em Uso animal (CEUA) do IB/UNESP-Rio Claro.

## 2.4. Ensaio de Toxicidade Crônica

A toxicidade crônica do extrato nebulizado de cascas de *X. americana* L. foi avaliada com base no protocolo do Guia OECD 452/2009 para toxicidade crônica (doses repetidas). Foram avaliadas as concentrações de 50, 150, 250 e 350 mg/kg/dia do extrato nebulizado de *X. americana* L., administradas aos camundongos, via gavagem gástrica, uma vez ao dia, por 12 semanas (84 dias), como mostra a tabela 1. Foram avaliados os parâmetros de toxicidade pelo número de mortes, estado geral de comportamento, como alteração na locomoção, alteração do tônus muscular, frequência respiratória, excitação, hipnose, convulsão, salivação, piloereção, lacrimejamento, diarreia e contorções abdominais, também foram observados variação de peso corpóreo. Ao fim do período de 12 semanas no 85° dia de experimentação, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical e seus órgãos pesados e avaliados macroscopicamente, coletada a medula óssea do fêmur dos animais para a análise de micronúcleo (MN) e avaliação toxigenética do extrato, também foi coletado o intestino na porção colorretal para avaliação da possível promoção de efeito carcinogênico de cólon do extrato nebulizado da casca do caule de *X. americana* L.

**Tabela 1:** Toxicidade crônica do extrato nebulizado de *Ximenia americana* L. para camundongos *Mus musculus*

Ensaio	Tratamentos	Períodos		
		Administração	Observação	Eutanásia
Toxicidade crônica	CN			
	CP			
	50 mg/kg/dia	12 semanas	12 semanas	85° dia
	150 mg/kg/dia	84 dias	84 dias	
	250 mg/kg/dia			
350 mg/kg/dia				

CN: Controle Negativo; CP: Controle Positivo

## 2.5. Ensaio de Micronúcleo (MN)

A avaliação de MN em células de medula óssea de roedores foi realizada seguindo os protocolos descritos por Schmid (1975), Ribeiro (2003), Maistro (2014) e OECD (2016), com modificações. Para extração da medula óssea, foram realizadas secções nas epífises dos fêmures, para que o canal medular ficasse exposto. Os fêmures de cada animal, com as epífises já abertas, foram lavados, em tubo Falcon<sup>®</sup>, injetando no canal medular, com o auxílio de uma seringa, 3 mL de soro fetal bovino (SFB). Esse SFB, foi aplicado no canal medular por várias vezes, até que toda medula fosse retirada. Os tubos foram centrifugados por 5 minutos a 1000 rpm. O sobrenadante foi descartado e a suspensão celular obtida foi homogeneizada, para ser usada na confecção de distensões medulares em lâminas. A coloração das lâminas seguiu o protocolo descrito por Ribeiro et al. (2003), com modificações, conforme descrito a seguir. As lâminas foram fixadas em álcool 70% por 5 minutos, secas e coradas, sequencialmente, pela solução de Wright por 3 minutos, solução de Wright e tampão fosfato pH 7,4 (1:1) por 1 minuto, e em uma mistura de tampão fosfato, água destilada e corante Giemsa (10:10:1), por 10 minutos. Na sequência, as lâminas foram lavadas em água corrente, para a retirada do excesso de corante e, depois secas, montadas em Entelan<sup>®</sup>. As lâminas de cada animal experimentado foram analisadas (teste cego) em microscopia de luz (objetiva de 100x). Foram contados 4000 Eritrócitos Policromáticos (PCE) por animal e observado o número de Micronúcleos de Eritrócitos Policromáticos (MNPCE).

## 2.6. Análise do Potencial Citotóxico

A citotoxicidade do extrato nebulizado de cascas de *X. americana* L. foi estimada pelo número de NCE presentes em 500 PCE analisados, para os diferentes ensaios realizados. O número de PCE foi dividido pelo número de NCE e os resultados obtidos neste cálculo, para os diferentes tratamento (n=5/tratamento), foram submetidos a análise estatística, de acordo com o teste de normalidade.

## 2.7. Análise do Potencial Mutagênico

Foram contados o número de MNPCE presentes em 4000 PCE analisadas por animal, para os diferentes ensaios realizados. Esse resultado (número de MNPCE/animal) foi comparado, estatisticamente, com os resultados obtidos no CN, de acordo com teste de normalidade.

## 2.8. Ensaio de Focos de Criptas Aberrantes (FCA)

A análise de focos de criptas aberrantes (FCA), foi realizada para investigar os possíveis danos ocasionados pela exposição ao extrato nebulizado de cascas de *X. americana* L. Para esta análise foi avaliada em microscopia de luz, a região do intestino grosso, porção colorretal dos animais experimentados, utilizando o método de avaliação, identificação e quantificação de FCA descrito por Bird (1987). Foram contabilizados os FCA que apresentaram < 3 Criptas Aberrantes e > 3 Criptas Aberrantes por animal, a média de cada parâmetro (< 3 e > 3), e a média total de FCA (< 3 + > 3), foram submetidos a análise estatística comparados com os resultados encontrados no CN, de acordo com o teste de normalidade.

## 2.9. Cálculo do Peso relativo dos órgãos

O peso relativo dos órgãos foi calculado pela seguinte fórmula:

$$\text{Peso Relativo} = a / b$$

Onde:

a = peso do órgão

b = peso corpóreo do animal

## 2.10. Análise estatística

A comparação dos resultados obtidos nas análises foi realizada de acordo com a distribuição dos dados, conferidos pelo teste de normalidade D'Agostino & Pearson. Foi aplicado, para os dados paramétricos, o teste estatístico ANOVA/Dunnett e, para os dados não paramétricos, o teste de Kruskal-Wallis/Dunn's. Para as análises, foi usado o software IBM® SPSS® Statistcs (versão 22). Os resultados que obtiveram níveis de significância ( $p < 0.05$ ), quando comparados com o controle negativo, foram considerados estatisticamente significativos.

### 2.11. Delineamento Experimental

Neste estudo, as concentrações de 50, 150, 250 e 350 mg/kg/dia do extrato nebulizado de cascas de *X. americana* L., foram administradas aos camundongos, via gavagem gástrica, uma vez ao dia, por 12 semanas (84 dias). Os grupos Controle Negativo (CN) e o Controle Positivo (CP) também, receberam, durante todo o experimento (84 dias), água, via gavagem. O CP recebeu ainda, via intraperitoneal, (i.p.), 20 mg/kg de DMH na proporção de 0,1 ml/10g de peso corpóreo (p.c.), sendo uma dose semanal (por quatro semanas). Para a simulação do mesmo estresse em todos os animais experimentados, o CN e os tratamentos receberam, via i.p., a solução de EDTA na concentração de 0,37 mg/mL, na proporção de 0,1 ml/10g de p.c, como pode ser observado na tabela 2.

**Tabela 2:** Delineamento experimental dos tratamentos realizados com camundongos *Mus musculus* expostos às concentrações de 50, 150, 250 e 350 mg/kg/dia do extrato nebulizado de cascas de *Ximenia americana* L. e os períodos de experimentação aplicados em cada teste realizado

Ensaio	Período		
	1° a 4° semana	5° a 8° semana	9° a 12° semana
CN	Água	Água + EDTA	Água
CP	Água	Água + DMH	Água
Trat. Crônico	<i>X. americana</i> L.	<i>X. americana</i> L.+ EDTA	<i>X. americana</i> L.

CN: Controle Negativo; CP: Controle Positivo; EDTA: ácido etilenodiamino tetraacético, administrado via intraperitoneal; DMH:1,2-dimetilhidrazina administrado via intraperitoneal; Água administrada via gavagem; *X. americana* L. administrada via gavagem

### 3. Resultados

#### 3.1. Exames físico e comportamental

Os ensaios de toxicidade crônica, desenvolvidos com camundongos *Mus musculus* expostos ao extrato nebulizado de *X. americana* L., não exibiram qualquer manifestação de toxicidade ou promoveram danos à saúde dos animais tratados, tais como alteração na locomoção, alteração do tônus muscular, frequência respiratória, excitação, hipnose, convulsão, salivação, piloereção, lacrimejamento, diarreia, efeitos sobre respiração e contorções abdominais. Os animais mantiveram suas atividades de locomoção e socialização dentro da normalidade esperada para a espécie.

#### 3.2. Letalidade

Não houve mortes entre os indivíduos submetidos às diferentes concentrações do extrato nebulizado de cascas de *X. americana* L., como pode ser observado na tabela 3.

**Tabela 3:** Toxicidade crônica do extrato nebulizado de *Ximania americana* L. em camundongos *Mus musculus*

<b>Ensaio</b>	<b>Tratamentos</b>	<b>Letalidade</b>
<b>Toxicidade Crônica</b>	CN	0/5
	CP	0/5
	50 mg/kg	0/5
	150 mg/kg	0/5
	250 mg/kg	0/5
	350 mg/kg	0/5

CN: Controle negativo; CP: Controle positivo.

#### 3.3. Peso corpóreo e ganho de peso

Pela avaliação do peso corpóreo dos animais tratados com o extrato nebulizado, foi observado que esses camundongos não apresentaram diferença estatisticamente significativa, quando comparados com os animais do grupo CN (Tabela 4). O peso inicial dos animais variou de 30,0 à 32,7g e o peso final de 35,0 à 62,0g. Foi observado que, durante o período experimental, os animais tiveram um grande ganho de peso (variação de  $15,2 \pm 5,40$  à  $21,8 \pm 6,30$ ), mas os resultados foram estatisticamente semelhante aos observado nos animais do grupo CN.



**Tabela 4:** Efeito das diferentes concentrações do extrato nebulizado de *Ximenia americana* L. no peso corporal dos camundongos *Mus musculus*, durante o período experimental

Ensaio	Tratamentos	Peso Inicial/Animal					Peso Final/Animal					Ganho de Peso
		A1	A2	A3	A4	A5	A1	A2	A3	A4	A5	Média±DP
Toxicidade Crônica	CN	32,4	32,7	32,6	32,2	31,5	52,0	45,0	48,0	52,0	46,0	16,3±3,28
	CP	32,8	32,7	31,6	30,0	30,0	50,0	47,0	55,0	41,0	40,0	15,2±5,40
	50 mg/kg	31,0	30,0	30,0	31,0	30,0	52,0	52,0	62,0	50,0	45,0	21,8±6,30
	150 mg/kg	31,0	30,0	30,0	31,0	30,0	53,0	48,0	41,0	49,0	55,0	20,8±2,94
	250 mg/kg	31,0	30,0	31,0	32,0	30,0	46,0	57,0	55,0	41,0	59,0	20,8±8,49
	350 mg/kg	30,0	30,0	30,0	30,0	30,0	50,0	53,0	35,0	45,0	51,0	16,8±7,22

CN: Controle negativo; CP: Controle positivo; A: Animal; Valores médios±desvio padrão da média representado em gramas.

### 3.5. Avaliação macroscópica e peso relativo dos órgãos

Na avaliação macroscópica dos órgãos dos animais expostos às diferentes concentrações do extrato nebulizado de cascas de *X. americana* L. apresentados, não foram observada quaisquer alteração na morfologia geral do órgão, ou na sua coloração, quando comparado ao grupo CN. Na relação de peso relativo dos órgãos dos animais experimentados, também não apresentaram diferença estatisticamente significativa, quando comparados aos do grupo CN (Tabela 5).

### 3.6. Avaliação do efeito citotóxico e mutagênico do extrato nebulizado de *X. americana* L. em eritrócitos da medula óssea de camundongo *Mus musculus*

A análise da citotoxicidade foi determinada pela relação PCE/NCE, foi possível observar que o extrato nebulizado de cascas de *X. americana* L. não apresentou potencial citotóxico para o ensaio de toxicidade crônica quando comparado ao CN. O potencial mutagênico do extrato nebulizado de *X. americana* L. foi avaliado pela análise de MNPCCE em 4.000 PCE contados. Como pode ser observado na tabela 6, não foram observadas diferenças significativas, quando os resultados dos tratamentos com o extrato foram comparados com os do grupo CN, sendo assim, o extrato nebulizado de *X. americana* L., nas concentrações de 50; 150; 250 e 350 mg/kg/dia não foi citotóxico nem mutagênico, quando testado em exposição crônica em camundongos *Mus musculus*.

**Tabela 5:** Efeito das diferentes concentrações do extrato nebulizado de *Ximenia americana* L.no peso relativo de órgãos dos comundongos *Mus musculus*, durante o período de experimentação

Ensaio	Tratamentos	Baço	Coração	Fígado	Pâncreas	Pulmões	Rins	Testículo	Tireóide
Toxicidade Crônica	CN	0,0028±0,0010	0,0040±0,0012	0,0380±0,0044	0,0042±0,0004	0,0046±0,0005	0,0100±0,0000	0,0040±0,0012	0,0050±0,0012
	CP	0,0030±0,0007	0,0042±0,0004	0,0360±0,0054	0,0046±0,0008	0,0056±0,0008	0,0100±0,0000	0,0048±0,0008	0,0060±0,0005
	50mg/kg/dia	0,0024±0,0016	0,0038±0,0008	0,0400±0,0070	0,0034±0,0008	0,0044±0,0005	0,0100±0,0000	0,0052±0,0010	0,0060±0,0018
	150mg/kg/dia	0,0032±0,0016	0,0038±0,0004	0,0400±0,0070	0,0040±0,0007	0,0052±0,0004	0,0100±0,0000	0,0048±0,0008	0,0058±0,0013
	250mg/kg/dia	0,0028±0,0004	0,0040±0,0007	0,0360±0,0054	0,0038±0,0008	0,0050±0,0010	0,0100±0,0000	0,0050±0,0007	0,0058±0,0008
	350mg/kg/dia	0,0026±0,0005	0,0040±0,0000	0,0380±0,0044	0,0042±0,0008	0,0048±0,0008	0,0100±0,0000	0,0058±0,0014	0,0058±0,0008

CN: Controle negativo; CP Controle positivo; Valores médios±desvio padrão da média representado em gramas.

**Tabela 6:** Avaliação do efeito citotóxico e mutagênico do extrato nebulizado de *Ximenia americana* L.em eritrócitos da medula óssea de camundongos *Mus musculus*

Ensaio	Tratamentos	Número de MNPCE/animal					MNPCE	PCE/NCE
		A1	A2	A3	A4	A5	Média±DP	Média±DP
Toxicidade crônica	CN	7	1	3	6	3	4,00±2,44	1,71±0,47
	CP	6	15	8	17	18	<b>12,8±5,44*</b>	1,76±0,42
	50 mg/kg/dia	6	5	6	7	5	5,80±0,83	1,49±0,44
	150 mg/kg/dia	5	7	5	12	11	8,00±3,31	1,35±0,53
	250 mg/kg/dia	8	5	3	8	5	5,80±2,16	1,76±0,70
	350 mg/kg/dia	4	5	5	8	4	5,20±1,64	1,81±0,80

CN: Controle Negativo; CP: Controle Positivo; A: Animais; MNPCE: Eritrócito Policromático Micronucleado; PCE: Eritrócito Policromático; NCE: Eritrócito Normocromático; \* estatisticamente significativo comparado ao CN p < 0.05 (ANOVA/Dunnet).

### 3.7. Avaliação do potencial carcinogênico de cólon do extrato nebulizado de *X. americana* L. em camundongos *Mus musculus*

O intestino dos animais foram analisados para a observação de formação FCA. Para isto, foi avaliado microscopicamente o intestino grosso, porção colorretal, dos grupos tratados nas diferentes concentrações (50; 150; 250 e 350 mg/kg/dia), e seus respectivos CN e CP, os resultados foram comparados estatisticamente, com o CN, que recebeu apenas a água, via gavagem gástrica e quatro doses de EDTA, via intraperitoneal. Neste ensaio, foi observada uma indução de danos FCA nos animais do CP, que receberam o agente indutor de carcinogenicidade de cólon DMH, já os animais que receberam os extratos de *X. americana* L., nas diferentes concentrações, não tiveram indução na formação de FCA (Tabela 7), mostrando que o extrato estudado, não apresenta potencial carcinogênico em cólon na exposição crônica.

**Tabela 7:** Avaliação do efeito carcinogênico do extrato nebulizado de *Ximania americana* L. sobre intestino grosso da porção colorretal de camundongos *Mus musculus*

Tratamentos	Concentrações	Número de FCA		Total
		>3	<3	
CN	-	9,60±5,32	0,0±0,00	4,80±5,320
CP	-	<b>30,2±7,22*</b>	<b>3,4±3,90*</b>	<b>16,8±15,14*</b>
Tratamento crônico	50 mg/kg/dia	15,8±11,3	0,4±0,89	8,10±11,09
	150 mg/kg/dia	9,20±4,81	0,2±0,44	4,70±5,730
	250 mg/kg/dia	7,00±5,38	0,8±1,09	3,90±4,900
	350 mg/kg/dia	8,80±4,54	1,0±1,00	4,90±5,150

CN: Controle Negativo; CP: Controle Positivo; \* estatisticamente significativo p<0,05 quando comparado ao CN (ANOVA/Dunnet).

## 4. Discussão e Conclusão

A indução de mutações em células germinativas pode resultar no aumento da frequência de doenças genéticas, baixa fertilidade, proles defeituosas e abortos, já as mutações em células somáticas estão relacionadas com a patologia de doenças crônicas degenerativas, como arteriosclerose e doenças cardiovasculares, e podem ser a base do processo de envelhecimento e de carcinogênese (FRANK, 2010; OLIVIER et al., 2010; CARTER et al., 2012; KHALIL, 2014). Embora essas manifestações não seja medida de carcinogenicidade, a mutagenicidade é frequentemente associada ao aparecimento do câncer. O aumento de danos no DNA, quebras ou perdas cromossômicas são importantes fatores para o desenvolvimento

de muitos tipos de câncer (SADIKOVIC et al., 2008; YONG et al., 2014; O'CONNOR, 2015).

De acordo com Pinto e Felzenszwalb (2003), o câncer é a designação dada ao conjunto de manifestações patológicas, que caracterizam-se pela perda de controle da proliferação celular e ganho de capacidade de invadir outros tecidos adjacentes. Esta perda de controle da proliferação celular é consequência de danos nos mecanismos de regulação do ciclo celular. Deste modo, o câncer é uma doença que resulta dos danos ocorridos nos genes que controlam o ciclo celular. As razões que levam os genes que regulam o ciclo celular a perderem suas funções são complexas e multifatoriais. Dentre essas razões, podemos citar predisposições genéticas hereditárias, e agentes físicos, químicos e biológicos. Diversos pesquisadores demonstraram que a grande maioria dos tumores humanos é causada por agentes químicos ligados ao estilo de vida e à dieta (STARE e JOZEFOWICZ, 2008; FERRINI et al., 2015).

Os FCA são considerados precursores de carcinogênese de cólon de intestino (DI GREGORIO et al., 1997; RODRIGUES et al., 2002). Os ensaios realizados com camundongos *Mus musculus*, expostos de forma crônica a diferentes concentrações do extrato nebulizado das cascas do caule de *X. americana* L. (50, 150, 250 e 350 mg/kg/dia), não induziram alterações macroscópicas nos órgãos dos animais, tampouco diferença estatisticamente significativa na massa relativa quando comparados ao CN. O extrato também não induziu a formação de FCA e ocasionando assim efeitos inflamatórios, que pudessem levar ao aparecimento de câncer colorretal nos camundongos tratados. Durante todo o período experimental, os animais não apresentaram alteração no comportamento, sinais de toxicidade, tampouco letalidade. Neste período, os animais apresentaram um alto ganho de peso, porém, não foi observado diferenças estatisticamente significativas quando comparados aos indivíduos do CN. O peso relativo dos órgãos também não foram significativamente diferentes ao CN. Estes resultados sugere que o extrato nebulizado de *X. americana* L., no período de exposição crônica, não produziu efeito tóxico para os animais, tampouco para seus órgãos.

Compostos com atividades biológicas, há tempos, vem sendo avaliados, quanto às suas propriedades tóxicas, carcinogênicas e mutagênicas (VILAR et al., 2009; VIEIRA et al., 2012; AHMED et al., 2013). Na avaliação de citotoxicidade, pela relação de PCE e NCE, o extrato nebulizado de *X. americana* L. não apresentou potencial citotóxico. A citotoxicidade de plantas medicinais deve ser considerada um problema de saúde pública, pois elas podem desencadear sérios efeitos adversos, intoxicação e esta interagir com outras drogas,

potencializando, assim, os seus efeitos (VEIGA JUNIOR et al., 2005). Sabe-se que muitas plantas medicinais utilizadas pela população, sob diversas formas, não são suficientemente estudadas, quanto à presença de substâncias citotóxicas. Desta forma o seu uso pode induzir efeitos adversos a seu consumidor e, conseqüentemente, danos à saúde do mesmo (BAGANTINI et al., 2007).

Na avaliação feita pelo ensaio do MN, o extrato nebulizado de *X. americana* L. não apresentou potencial mutagênico, para nenhuma das concentrações testadas. Estudo do potencial mutagênico de extratos vegetais é de fundamental importância para a produção de novos produtos com potencial terapêutico, e também servir como um parâmetro de segurança para o uso desses produtos (PERON et al. 2008).

Com os resultados obtidos neste estudo, podemos concluir que o extrato nebulizado de *X. americana* L. quando em exposição crônica, não apresenta efeitos citotóxicos, mutagênicos ou carcinogênicos de cólon, podendo ser considerado de uso seguro, mesmo em administração por período prolongado (crônico). Porém, este estudo avaliou o extrato nebulizado somente quanto à indução de carcinogênese colorretal em camundongos *Mus musculus*, sendo necessário, assim, novos estudos que certifiquem a segurança do uso deste extrato vegetal. Desta forma, sugerimos que novos estudos sejam realizados com este extrato, usando outros organismos testes e ensaios tanto *in vivo* como *in vitro*.

## 5. Referências Bibliográficas

- ALMEIDA NETO, X. J., MEDEIRO, F. P. M., MELO, A. J. M., SILVA, J. C., DANTAS, J. P., Avaliação do efeito mutagênico da palma forrageira (*Opuntia fícus-indica* Mill) através do teste do micronúcleo em medula óssea de ratos (*Rattus norvegicus*, Linhagem Wistar) *in vivo*. Revista de Biologia e Ciência da Terra, v.5, n.2, p. 1-11, 2005.
- ASIIMWE, S., KAMATENESI-MUGISHA, M., NAMUTEBI, A., BORG-KARLSSON, A.K., MUSIIMENTA, P., Ethnobotanical study of nutri-medicinal plants used for the management of HIV/AIDS opportunistic ailments among the local communities of western Uganda. J. Ethnopharmacol. v.150, 639-648, 2013.
- ARAÚJO, M. R. S.; MONTE, F. J.; BRAZ-FILHO, R. A. New sesquiterpene form *Ximenia americana* Linn. Helvetica chimica Acta, v. 92, n.1, p. 127-132, 2009.
- ASRES, K., BUCAR, F., DE CLERCQ, E., KARTNIG, T., PANNECOUQUE, C., Antiviral activity against human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) and type 2 (HIV-2) of ethnobotanically selected ethiopian medicinal plants. Phytother R v.15, p. 62-69, 2001.
- BAGATINI, M. D.; SILVA, A. C. F.; TEDESCO, S. B. Uso do sistema teste de *Allium cepa* como bioindicador de genotoxicidade de infusões de plantas medicinais. Revista Brasileira de Farmacognosia, v. 17, n. 3, p. 444-447, 2007.

BASKARAN, N. et al. Chemopreventive Potential of Coumarin in 7, 12-dimethylbenz [ a ] anthracene Induced Hamster Buccal Pouch Carcinogenesis. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, v. 13, p. 5273-5279, 2012.

BENOIT F, VALENTIN A, PELISSIER Y, DIAFOUKA F, MARION C., *In vitro* antimalarial activity of vegetal extracts used in West African traditional medicine. *Am J Trop Med Hyg* v.54, p.67-71, 1996.

BURKILL, H., Royal Botanic gardens. Surrey v.4 p.264-266, 1997.

CARNEIRO, C. C., Avaliação das atividades genotóxica, antigenotóxica, citotóxica, anticitotóxica, angiogênica e antiangiogênica de elagitaninos utilizando ensaios *in vitro* e *in vivo*. (2016). Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás., 122p.

CARTER, S. L., CIBULSKIS, K., HELMAN, E., MCKENNA, A., SHEN, H., ZACK, T., LAIRD, P. W., ONOFRIO, R. C., WINCKLER, W., WEIR, B. A., BEROUKHIM, R., Absolute quantification of somatic DNA alterations in human cancer. *Nat Biotechnol*. n. 20, p. 413-426, 2012.

CHENG, H., YUEBO, Z., ZHENWEI, G., SHENG, X., LI, Z., WEI, Z., QIN, Y., Berberine inhibits 3T3-L1 adipocyte differentiation through the PPAR $\gamma$  pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, n.348, p. 571-578, 2006.

COUTO, R. O. Obtenção e caracterização do extrato seco padronizado da *Rosmarinus officinalis* L. (LAMIACEAE). (2011). Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Goiás, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Fármacos e Medicamentos. 128p.

CUNHA, L. C., Azeredo, F. S., Mendonça, A. C. V., Vieira, M. S., Pucci, L. L. , Valadares, M. C., Freitas, H. O. G., Sena, A. A. S., Lino Junior, R. S., Avaliação da toxicidade aguda e subaguda, em ratos, do extrato etanólico das folhas e do látex de *Synadenium umbellatum* Pax. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, v.19, n.2, p. 403-411, 2009.

DI GREGORIO, C. et al. Histology of aberrant crypt foci in the human colon. *Histopathology*, v. 30, n. 4, p. 328-34, 1997.

FEYSSA, D. H., NJOK, J. T., ASFAW, Z., Uses and management of *Ximenia americana*, olacaceae in semi-arido east Shewa, Ethiopia. *Pakistan Journal of Botany*, v.44, n. 4, p.1177-1184, 2012.

FERRINI, K., GHELFI, F., MANNUCCI, R., TITTA, L., Lifestyle, nutrition and breast cancer: facts and presumptions for consideration. *E Cancer*. n.9, p.1-11, 2015.

FIGUEIREDO, F. R. G. Ensaios mutagênicos em decocto de *Cochlospermum regium* (Mart. et. Schr.) Pilger (Bixaceae) em *Poecilia reticulata* e linfócitos humanos. 2012. 115f. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais e Saúde) – Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Goiânia, 2012.

FRANK, S. A., Somatic evolutionary genomics: mutations during development cause highly variable genetic mosaicism with risk of cancer and neurodegeneration. PNAS. n.107, p.1725-1730, 2010.

GRONHAUG, T. E., GLÆSERUD, S., SKOGSRUD, M., BALLO, N., BAH, S., DIALLO, D., PAULSEN, B. S., Ethnopharmacological survey of six medicinal plants from Mali, West-Africa. J. Ethnobiol. Ethnomed. n.26, v.4, p.1-11, 2008.

GEORGE, P., Concerns regarding the safety and toxicity of medicinal plants – An overview. Journal Applied Pharmaceutical Science, v. 1, n.6, p. 40-44, 2011.

HAQ, I., Safety of plants medicinal. Pakistan Journal of Medical Research, v. 43, n.4, p. 1-8, 2004.

JAMES, D. B., ABU, E. A., WUROCHEKKE, A. U., ORGI, G. N. Phitochemical and Antimicrobial investigation of the aqueous and methanolic extracts of *Ximenia Americana*. Journal of Medical Science, Zaria, v.7, n. 2, pp. 284-288, 2007.

KABRAN, G. R., AMBEU, N. C., MAMYRBÉKOVA-BÉKRO, J. A., BÉKRO, Y. A., Phenols and Total Flavonoids in Organic Extracts of Ten Plants Used in Breast Cancer Tradithapia in Côte d'Ivoire. Eur J Sci Res. n.68, p.182-190, 2012.

KHALIL , C. A., The emerging role of epigenetics in cardiovascular disease. Ther Adv Chronic Dis. n.5, p.178-187, 2014.

LE, N. H. T., MALTERUDA, K. E., DIALLOB, D., PAULSENA, B. S., NERGÅRDA, C. S., WANGENSTEEN, H. Bioactive polyphenols in *Ximenia americana* and the traditional use among Malian healers. J. Ethnopharmacol. n.139, v.3, p.858-862, 2012.

MAISTRO, E. L. The *in vivo* rodent micronucleus test. L.M. Sierra, I. Gaivão (Eds.), Genotoxicity and DNA Repair: a Practical Approach, Methods in Pharmacology and Toxicology, Springer Science+Business Media, New York, p. 103–113, 2014.

MELO, J. G. et al. Medicinal plants used as antitumor agents in Brazil: an ethnobotanical approach. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, v. 2011, p. 365-359, 2011.

MOURA, N. A., Efeitos da ingestão de Yacon (*Smallanthus sonchifolius*) sobre o processo de carcinogênese de cólon induzido pela 1,2- dimetilhidrazina em ratos Wistar (2012). Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP, Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada. 76p.

MELO, J. G. et al. Medicinal plants used as antitumor agents in Brazil: an ethnobotanical approach. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, v. 2011, p. 365-359, 2011.

Organization for economic cooperation and development - OECD 452 (2009), Chronic toxicity studies. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing, Paris.

OLIVEIRA, F.C.S.; BARROS, R.F.M.; MOITA NETO, J. M.; Plantas medicinais utilizadas em comunidades rurais de Oeiras, semiárido piauiense. Revista Brasileira de Plantas Medicinais. ed.12, v.03 p. 282-301. 2010.

O'CONNOR, M. J., Targeting the DNA damage response in cancer. Mol Cell. n.60, p.547-560, 2015.

PARK, M, Y. et al., 28 days repeated oral dose toxicity tests of aqueous extracts of mahawangyounpae-tang, a polyherbal formula. Food and Chemical Toxicology, v. 48, p.2477-2482, 2010.

PERON, A. P., FELIPES, L., MATTAGE, G. I., CANTAGALLI, L. B., MAURIUCCI, R. G., VICENTINI, V. E. P., Avaliação mutagênica das plantas medicinais *Baccharis trimera* Less. e *Solanum melongena* L. em células de medula óssea de ratos Wistar. Revista Brasileira de Biociências, Porto Alegre, v. 6, n.2, p.127-130, 2008.

PINTO, L. F. R., FELZENSZWALB I., Genética do câncer humano. In.: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. Mutagênese Ambiental. 1 a ed. Canoas: ULBRA, 2003. Cap. 2.

RAZA, M., AL-SHABANAH, A. O., EL-HADIYAH, T. M., AL-MAJED, A. A., Effect of prolonged vigabatrin treatment on haematological and biochemical parameters in plasma, liver and kidney of Swiss albino mice. Sci PharM. n. 70, p.135-145, 2002.

REYES-GARCÍA, V., The relevance of traditional knowledge systems for ethnopharmacological research: theoretical and methodological contributions. Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine, v.6, p.32, 2010.

RIBEIRO, L. R., SALVADORI, D. M. F., MARQUES, E. K., Mutagênese Ambiental. 1 ed. Brasil: ULBRA, p. 355, 2003.

RODRIGUES, M.A.M. et al. Aberrant crypt foci and colon cancer: comparison between a short- and medium term bioassay for colon medium-term bioassay for colon carcinogenesis using dimethylhydrazine in Wistar rats. Braz J. Med. Biol. Res. , v. 35, n. 3, p.351-355, 2002.

SACANDE, M., VAUTIER, H., *Ximenia americana* L. Forest e Landse Denm. n.112, p.1-2, 2006.

SADIKOVIC, B., AL-ROMAIIH, K., SQUIRE, J. A., ZIELENSKA, M., Cause and Consequences of Genetic and Epigenetic Alterations in Human Cancer. Curr Genomics. n.9, p.394-408, 2008.

SARMENTO, J. D. A., MORAIS, P. L. D., SOUZA, F. I., MIRANDA, M. R. A., Physical-chemical characteristics and antioxidant potential of seed and pulp of *Ximenia americana* L. from the semiarid region of Brazil .African Journal of Biotechnology, n.4, v.20, p.1743-1752, 2015.

SCHMID, W., The micronucleus test. Mutat. Res., n.31, p. 9-15, 1975.

SHETAR, A. K., SATEESH, M.K., KALIWAL, B.B., VEDAMURTHY SHPITZ, A.B., BOMSTEIN, B., MEKORI, Y., COHEN, Y., KAUFMAN, R., GRANKIN, Z., BERNHEIM,



M., In vitro antidiabetic activities and GC-MS phytochemical analysis of *Ximenia americana* extracts J. Proliferating cell nuclear antigen as a marker of cell kinetics in aberrant crypt foci hyperplastic polyps, adenomas, and adenocarcinomas of the human colon. Am. J. Surg, v.174, p.425-430, 2017.

SILVA, G. G., SOUZA, P. A., MORAIS, P. L. D., SANTOS, E. C., MOURA, R. D., MENEZES, J. B., Caracterização do fruto de ameixa silvestre (*Ximenia americana* L.). Rev. Bras. Frutic. n.30, v.2, p.311-314, 2008.

STARE SM, JOZEFOWICZ JJ. The Effects of Environmental Factors on Cancer Prevalence Rates and Specific Cancer Mortality Rates in a Sample of OECD Developed Countries. Int J Appl Econom. 2008; 5: 92-115

TEO, S., STIRLING. D., THOMAS, S., HOBERMAN, A., KIORPES, A., KHETANI, V., A 90-day oral gavage toxicity study of p-methylphenidate and d,l-methylphenidate in Sprague-Dawley rats. Toxicology. n.179, p.183-196, 2002.

TOFOVIC, S. P., JACKSON, E. K., Effects of long-term caffeine consumption on renal function in spontaneously hypertensive heart failure prone rats. J Cardiovasc Pharmacol n.33, p.360-366, 1999.

TRAESEL, G. K., DE SOUZA, J. C., DE BARROS, A. L., SOUZA, M. A., SCHMITZ, W. O., MUZZI, R. M., OESTERREICH, S. A., ARENA, A. C., Acute and subacute (28 days) oral toxicity assessment of the oil extracted from *Acrocomia aculeata* pulp in rats. Food Chem. Toxicol. n.74, p.320-325, 2014.

TRAORE, M. S., BALDE, M. A., CAMARA, A., BALDE, E. S., DIANE, S., DIALLO, M. S. T., KEITA, A., COS, P., MAES, L., PIETERS, L., The malaria co-infection challenge: An investigation into the antimicrobial activity of selected Guinean medicinal plants. J. Ethnopharmacol. n.174, 576-581 2015.

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

VOSS, C., EYOL, E., BERGER, M. R., Identification of potent anticancer activity in *Ximenia americana* aqueous extracts used by African traditional medicine. Toxicology and Applied Pharmacology, v. 211, p.177-178, 2006.

YONG, Z. W. E., ZAINI, Z. M., KALLARAKKAL, T. G., KAREN-NG, L. P., RAHMAN ZA, A., ISMAIL, S. M., SHARIFAH, N. A., MUSTAFA, W. M. W., ABRAHAM, M., TAY, K. K., ZAIN, R. B. Genetic alterations of chromosome 8 genes in oral cancer. Sci Rep. n.1, p.1-9, 2014.

**Artigo 3: Efeito quimiopreventivo do extrato nebulizado de cascas de *X. americana* L., para carcinogênese colorretal, induzida pela 1,2-dimetilhidrazina, em camundongos *Mus musculus***

Jaqueline Aparecida de Oliveira Dalavilla<sup>1</sup>, Ana Claudia Dantas de Medeiros<sup>2</sup>, Maria Aparecida Marin-Morales<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>UNESP - Universidade Estadual Paulista, Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Av 24-A, 1515, CEP 13506-900, Rio Claro, São Paulo, Brasil.

<sup>2</sup>UEPB - Universidade Estadual da Paraíba, Departamento de Farmácia, Centro de Ciências Biológicas e da saúde, Rua Baraúnas, 351, CEP 58429-500, Campina Grande, Paraíba, Brasil.

\*Autor correspondente. Tel.: +55 19 3526 4143; fax: +55 19 35360009.

e-mail: marin.morales@unesp.br

### **Resumo**

As cascas do caule de *X. americana* L. são amplamente utilizadas na medicina popular para diversas patologias, incluindo contra o câncer. Extratos desta planta vêm sendo citados na literatura como de ação anticancerígena para câncer colorretal de ratos e de humanos *in vitro*. Várias substâncias derivadas de plantas possuem a capacidade de modular os complexos mecanismos envolvidos na patologia de doenças crônicas, tais como o câncer, a prevenção do câncer acontece sempre que ocorre regressão, inibição ou redução de sua incidência. Neste trabalho foram avaliados os efeitos quimioprotetor e quimiopreventivo do extrato nebulizado de cascas de *X. americana* L. nas concentrações de 50, 150, 250 e 350 mg/kg/dia em células da linhagem branca tais como os leucócitos e a seu efeito em prevenir, regredir, inibir ou reduzir a incidência de FCA (Focos de criptas aberrantes) consideradas como lesões pré-neoplásicas na porção colorretal do intestino induzidas nesse estudo pela DMH- 1,2 dimetilhidrazina aos animais expostos a diferentes tratamentos, tais como: pré-tratamento, tratamento simultâneo, pós-tratamento e tratamento contínuo com o extrato nebulizado das cascas do caule de *X. americana* L. No presente trabalho não foi observado um processo inflamatório avaliado pela contagem diferencial de leucócitos circulantes no sangue nos diferentes tratamentos realizados, o que corrobora com o resultado encontrado na análise de FCA onde foi observada uma diminuição das criptas aberrantes (CA- lesões pré-neoplásicas). Sendo assim o extrato das cascas do caule de *X. americana* L. teve uma ação quimioprotetora

e quimiopreventiva no câncer colorretal induzido pelo DMH. Acredita-se que esse efeito seja devido aos constituintes fitoquímicos presentes neste extrato, como ácido gálico, já que esse fitoquímico é reportado na literatura científica como de ação anticancerígena.

**Palavras-chave:** Anticarcinogênese; Carcinogênese colorretal; Resposta imunológica; Ameixa-do-mato; Ameixa-do-sertão; Planta medicinal

## 1. Introdução

No Brasil, as estimativas de novos casos de câncer colorretal, sugerem que 17.380 homens e 18.980 mulheres serão acometidos por esta doença, nos anos 2018 e 2019. Esses valores correspondem a um risco estimado de 16,83 casos novos a cada 100 mil homens e 17,90 para cada 100 mil mulheres. O câncer colorretal é o segundo tipo de câncer mais frequente em mulheres e o terceiro tipo mais comum em homens (INCA, 2018). O câncer é uma doença multifatorial que pode ser influenciada por fatores genéticos, ambientais e relacionados ao estilo de vida (SANDLER, 1996; BOYLE e LEON, 2002; DIAS et al., 2007).

A inflamação é resultado de uma resposta do organismo a efeitos adversos de substâncias, que podem ser percebidas pelo sistema imunológico inato como agentes estranhos ou nocivos à saúde do indivíduo. Através de inúmeras vias de resposta, destinadas a eliminar do corpo substâncias nocivas, as células do sistema imune inato (como leucócitos), citocinas, outros mediadores inflamatórios e proteínas séricas, são recrutadas para o local de ataque antigênico, produzindo um estado inflamatório local, caracterizado pelos sinais de inchaço, vermelhidão, calor e dor (JOHNSTON, 2017). No intestino, as manifestações microscópicas do estado inflamatório incluem a liberação e recrutamento de fatores, como as numerosas células do sistema inato e adaptativo do sistema imunológico, como as citocinas e as prostaglandinas (SNAPPER e ABRAHAM, 2016). Essa continuação imprópria do estado inflamatório pode levar a carcinogênese colorretal (COUSSENS, 2002).

O câncer pode ser dividido em três estágios; iniciação, quando há a indução de danos/mutação na molécula do DNA, que ocorre devido a exposição à carcinogenos e à falha no mecanismo de reparo de DNA; promoção, onde ocorrem a hiperproliferação, a remodelação tecidual e a inflamação, devido à expansão de células iniciadas; e progressão, onde as células pré-neoplásicas formam tumores, por expansão clonal, facilitado o aumento da instabilidade genômica e alterações da expressão gênica celular (FERGUSON et al., 2015) Os diferentes estágios da carcinogênese requerem diferentes abordagens quimioterápicas, devido à natureza evolutiva do câncer, o que leva a alterações da sensibilidade à terapia.

Especificamente, a progressão do tumor é associada à instabilidade genômica, pelo acúmulo de mutações nos fatores envolvidos na proliferação celular, apoptose, reparo de DNA, dentre outros (FRESCO et al., 2006; FERGUSON et al., 2015). FCA são lesões pré-neoplásicas, consideradas marcadores do câncer de cólon e muito utilizadas em estudos experimentais de quimioprevenção (CORPET e PIERRE, 2005; FEMIA, 2010). Essas lesões são encontradas no cólon de roedores tratados com carcinógenos químicos e também em seres humanos acometidos por polipose ou câncer de cólon (PRETLOW, 1990; ALRAWI, 2006).

A prevenção do câncer acontece sempre que ocorre regressão, inibição ou redução de sua incidência (BIRD e GOOD, 2000). Os quimioterápicos atuam no estágio de promoção, inibindo a proliferação, aumentando a taxa de morte celular e induzindo a diferenciação de células tumorais (MORSE e STONNER, 1993). A quimioprevenção pode ser definida como a utilização de compostos sintéticos ou naturais que previnem o desenvolvimento do câncer, por inibição a etapa de iniciação da carcinogênese ou a progressão da malignidade (WU et al., 2011). Estudos mostram que, aproximadamente, um terço de todas as plantas e vegetais apresentam ação antioxidante e anti-inflamatória (WANG et al., 2014). Várias substâncias derivadas de plantas possuem a capacidade de modular os complexos mecanismos envolvidos na patologia de doenças crônicas, como câncer, envelhecimento e diabetes (TAPSELL et al., 2006; KENNEDY e WIGHTMAN, 2011).

As cascas do caule de *X. americana* L. são amplamente utilizadas na medicina popular (GRONHAUG et al., 2008; JAMES et al., 2008; LE et al., 2012, ARAGÃO et al., 2018), sendo indicadas para tratamentos de diversas patologias como, por exemplo, o câncer (OLIVEIRA et al., 2010). A planta *X. americana* possui compostos bioativos, denominados de fitoquímicos, como flavonóides, taninos, ácido gálico, glicosídeos cardiotônicos, quercetina, antraquinonas, saponinas e terpenóides (MAIKAI, et al., 2008; LE et al., 2012; BRANDÃO et al., 2014; ARAGÃO et al., 2018; SANTANA et al., 2018). Os efeitos desses compostos, presentes em diferentes extratos de *X. americana* L., vêm sendo descrito na literatura como de ação anticancerígena para linhagens celulares de câncer colorretal de ratos (VOSS et al., 2006; PERVAIZ et al., 2015) e linhagens celulares de câncer colorretal de humanos (KABRAN et al., 2017).

Frente a todo exposto, considerando as características fitoquímicas e bioativas da espécie *X. americana* L. e a sua possível ação quimioprotetora, este estudo teve como objetivo avaliar o efeito quimiopreventivo do extrato nebulizado de *X. americana* L. para a prevenção de câncer colorretal, induzido pelo DMH, um agente indutor específico de carcinogenicidade, em camundongos da espécie *Mus musculus*.

## 2. Material e Métodos

### 2.1. Material vegetal e preparação do extrato

O material botânico utilizado neste estudo foi a espécie *Ximenia americana* L. que foi coletada na região semiárida do Estado da Paraíba. Seus tipos foram depositados (exsicatas da planta) no Herbário Professor Jayme Coelho de Moraes da Universidade Federal da Paraíba, sob o número de registro EAN-14049. Neste estudo foram avaliados os efeitos apenas das cascas dos caules da planta, material este que foi utilizado para o preparo de um extrato nebulizado. Primeiramente, as cascas foram secas a 40 °C, pulverizado em moinho de facas, processadas por maceração a frio com água e etanol (30 %/70 %, respectivamente), para a obtenção do extrato hidroalcoólico. Para a obtenção do extrato nebulizado, o extrato hidroalcoólico foi submetido a secagem por aspersão em *spray drying* (LabPlant®), temperatura de entrada de 140 °C e fluxo de 3 mL/min. O adjuvante de secagem foi o Aerosil 200® (dióxido de silício coloidal), na proporção de 20 %, em relação ao resíduo o seco.

### 2.2. Agente indutor de carcinogênese colorretal

A substância utilizada no tratamento do controle positivo (CP) e nos tratamentos de anticarcinogenicidade, para a indução de carcinogênese colorretal, foi a 1,2-dimetilhidrazina (DMH marca Sigma®, CAS: n° 306-37-6), concentração de 20 mg/kg, diluída em solução de EDTA (0,37mg/ml). A solução da DMH foi administrada aos animais pela via intraperitoneal (i.p), na proporção de 0,1 ml/10g de peso corpóreo (p.c), uma vez na semana durante quatro semanas.

### 2.3. Animais e delineamento experimental

Foram utilizados camundongos machos da espécie *Mus musculus*, linhagem Swiss, com peso inicial aproximado de 30 gramas. Os animais foram adquiridos no biotério central da Universidade Estadual Paulista (UNESP), campus de Botucatu, São Paulo, Brasil. Os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com os princípios éticos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e com a aprovação (Protocolo: 26/2016) do Comitê de Ética em Uso animal (CEUA) do IB/UNESP-Rio Claro.

As avaliações dos efeitos anticarcinogênicos de cólon foram realizadas com quatro diferentes concentrações do extrato nebulizado de *X. americana* L. (50, 150, 250 e 350 mg/kg/dia), em quatro períodos experimentais (pré-tratamento; tratamento simultâneo; pós-tratamento e tratamento contínuo), e dois grupos de tratamento controle (CN e CP). Todos os tratamentos (extrato, CN e CP) foram desenvolvidos com umn=5 animais, totalizando 90

animais experimentos nesta avaliação. Os animais foram submetidos ao tratamento por 12 semanas, conforme protocolo sugerido por Mauro et al. (2008), com modificações. O delineamento experimental está apresentado na tabela 1. Foi coletado sangue periférico, por punção caudal, para a contagem diferencial de leucócitos em dois períodos (24 horas antes do início da experimentação e 24 horas após a última administração, momentos antes da eutanásia). Semanalmente esses animais foram pesados e seu peso corpóreo anotado, para posterior análise do ganho de peso. Durante o período experimental foram observados os possíveis efeitos tóxicos, após a administração dos extratos, e a possível mortalidade dos animais. Após as 12 semanas de tratamento, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical, seus órgãos coletados, pesados e avaliados macroscopicamente.

**Tabela 1:** Delineamento experimental dos tratamentos realizados em camundongos *Mus musculus*, com diferentes concentrações do extrato de *X. americana* L. (50, 150, 250 e 350 mg/kg/dia), para a avaliação do potencial anticarcinogênico de cólon

Ensaio	Período		
	1° a 4° semana	5° a 8° semana	9° a 12° semana
CN	Água	Água + EDTA	Água
CP	Água	Água + DMH	Água
Pré-tratamento	<i>X. americana</i> L.	Água + DMH	Água
Trat. Simultâneo	Água	<i>X. americana</i> L.+ DMH	Água
Pós- Tratamento	Água	Água + DMH	<i>X. americana</i> L.
Trat. Contínuo	<i>X. americana</i> L.	<i>X. americana</i> L.+ DMH	<i>X. americana</i> L.

CN: Controle Negativo; CP: Controle Positivo; DMH: 1,2-dimetilhidrazina administrado via intraperitoneal; EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético administrado via intraperitoneal, Água administrada via gavagem, *X. americana* L. administrada via gavagem.

#### 2.4. Ensaio de Focos de Criptas Aberrantes (FCA)

Para a realização dos ensaios de FCA, foi retirado o intestino grosso dos animais. O intestino foi então amarrado, na porção entre o ceco e o reto, com um fio de algodão, lavado com solução fisiológica 9 %, com o auxílio de uma seringa, para a retirada das fezes e seccionados, longitudinalmente, com o auxílio de uma tesoura. Suas extremidades foram presas com alfinetes emborrachados em placas de isopor®, e a placa foi, imediatamente,

imersa em solução de formalina tamponada a 10 %, para fixação do material. No momento da análise, o intestino foi corado, por 10 minutos, em solução de Giemsa 10% e montado em lâmina de vidro, com a mucosa voltada para cima. A análise foi realizada em microscopia de luz, (objetiva de 40x), para avaliação (teste cego) e a identificação e quantificação dos FCA, realizada conforme a técnica descrita por Bird (1987).

### **2.5. Ensaio de Contagem diferencial de Leucócitos (CD)**

As coletas de sangue foram realizadas em dois períodos: 24h antes do início da experimentação (1° coleta) e momentos antes da eutanásia, após 24 h da última administração (2° coleta). Para o ensaio de CD, foi coletada uma gota de sangue periférico, por punção caudal, usada para a confecção de extensões sanguíneas. As lâminas foram fixadas, por 5 minutos, em álcool 70 %, deixadas para secar por 24h. A seguir, as lâminas foram coradas com corante Leishman, por 10 minutos, e analisadas (teste cego) em microscopia de luz (objetiva de 100x). Foram contadas um total de 100 células por lâmina/animal, entre elas linfócitos, neutrófilos, monócitos, eosinófilos e basófilos.

### **2.6. Análise da redução de danos de FCA**

A porcentagem de redução de danos de FCA no cólon dos camundongos, ocasionadas pelos efeitos do extrato nebulizado de *X. americana* L., foi calculada pela seguinte fórmula:

$$\% \text{ RD} = [(a - b) / (a - c)] \times 100$$

Onde:

a = média de FCA do CP;

b = média de FCA dos tratamentos;

c = média de FCA do CN.

### **2.7. Cálculo do Peso relativo dos órgãos**

O peso relativo dos órgãos foi calculado pela seguinte fórmula:

$$\text{Peso Relativo} = a / b$$

a = peso do órgão

b = peso corpóreo do animal

### **2.8. Análise estatística**

A comparação dos resultados obtidos nas análises foi realizada de acordo com a distribuição dos dados, conferidos pelo teste de normalidade D'Agostino & Pearson. Foi

aplicado, para os dados paramétricos, o teste estatístico ANOVA/Dunnet e, para os dados não paramétricos, o teste de Kruskal-Wallis/Dunn's. Para as análises, foi usado o software IBM® SPSS® Statistcs (versão 22). Os resultados que obtiveram níveis de significância ( $p < 0,05$ ), quando comparados com o controle positivo, para FCA, e com o controle negativo, para CD, peso corpóreo e peso relativo dos órgãos, foram considerados estatisticamente significativos.

### 3. Resultados

#### 3.1. Peso corpóreo dos animais

Na avaliação do peso corpóreo dos animais, avaliado durante o período de experimentação, não mostrou diferença estatisticamente significativa entre os diferentes ensaios realizados com os animais tratados com o extrato nebulizado de *Ximenia americana* L. e seus respectivos controles (Tabela 2). Pode ser visto nesta tabela que o peso inicial dos camundongos experimentados variou de 30,20 á 32,28 g e o peso final de 43,80 á 52,00 g. O ganho de peso, entre todos os animais experimentados, variou de 13,36 á 21,60 g. Embora os animais tratados tenham tido um alto ganho de peso, quando comparados com o ganho de peso dos animais do CN, os valores não se configuraram como diferenças estatisticamente significativos.

**Tabela 2:** Peso corpóreo dos camundongos *Mus musculus* nos diferentes ensaios, tratados com extrato nebulizado de *Ximenia americana* L.

Ensaio	Concentrações	Peso Inicial	Peso Final	Ganho de Peso
Controles	CN	32,28±0,476	48,60±3,286	16,32±3,285
	CP	31,42±1,379	46,6±6,268	15,18±5,402
Pré-Tratamento	50mg/kg/dia	31,20±0,938	49,33±4,509	18,13±4,247
	150mg/kg/dia	30,54±0,589	51,60±2,880	21,06±2,551
	250mg/kg/dia	30,72±0,995	45,60±4,277	14,88±3,869
	350mg/kg/dia	30,44±0,606	43,80±2,489	13,36±2,201
Trat. Simultâneo	50mg/kg/dia	30,40±0,894	44,80±2,489	14,40±8,354
	150mg/kg/dia	30,40±0,547	46,60±6,308	16,32±5,848
	250mg/kg/dia	30,20±0,447	45,20±5,449	15,20±5,449
	350mg/kg/dia	30,40±0,547	49,40±6,804	19,00±6,964
Pós-Tratamento	50mg/kg/dia	30,40±0,547	45,20±2,167	14,80±1,923
	150mg/kg/dia	30,20±0,447	47,60±2,880	17,60±2,880
	250mg/kg/dia	30,40±0,547	48,20±5,215	17,80±4,868
	350mg/kg/dia	31,00±0,707	48,00±3,464	17,00±3,937
Trat. Contínuo	50mg/kg/dia	30,40±0,547	52,00±4,636	21,60±4,929
	150mg/kg/dia	30,40±0,547	50,40±6,804	20,00±7,211
	250mg/kg/dia	30,60±0,547	47,60±4,722	17,00±4,743
	350mg/kg/dia	30,60±0,547	45,40±4,393	14,80±4,494

CN: Controle negativo; CP: Controle positivo; Valores expressos em gramas (g) da média ± desvio padrão da média.



### 3.2. Mortalidade

A mortalidade observada entre o número de animais dos diferentes ensaios, está apresentada na tabela 3. Foi observada no pré-tratamento duas mortes para concentração de 50 mg/kg/dia, que ocorreram logo após a administração da 1,2-dimetilhidrazina (DMH) (n=2/5) e uma morte no pós-tratamento, concentração de 350 mg/kg/dia, um dia antes da eutanásia (n=1/5). Em momento algum foi observado sinais de toxicidade nos animais tratados com as diferentes concentrações de extrato nebulizado de *X. americana* L.e tampouco no grupo controle negativo (CN). Já para os animais do controle positivo (CP), foi observado, após a administração da DMH, excitabilidade para todos os indivíduos testados com essa droga.

**Tabela 3:** Mortalidade de camundongos *Mus musculus* tratados com as diferentes concentrações testadas do extrato nebulizado de *Ximenia americana* L.

Ensaio	Concentração	Mortalidade
Controles	CN	0/5
	CP	0/5
Pré- tratamento	50 mg/kg/dia	2/5
	150 mg/kg/dia	0/5
	250 mg/kg/dia	0/5
	350 mg/kg/dia	0/5
Trat. Simultâneo	50 mg/kg/dia	0/5
	150 mg/kg/dia	0/5
	250 mg/kg/dia	0/5
	350 mg/kg/dia	0/5
Pós- Tratamento	50 mg/kg/dia	0/5
	150 mg/kg/dia	0/5
	250 mg/kg/dia	0/5
	350 mg/kg/dia	1/5
Trat. Contínuo	50 mg/kg/dia	0/5
	150 mg/kg/dia	0/5
	250 mg/kg/dia	0/5
	350 mg/kg/dia	0/5

CN: Controle negativo; CP: Controle positivo; Morte de 2 animais no ensaio de pré-tratamento na concentração de 50mg/kg/dia e 1 animal no ensaio de pós-tratamento na concentração de 350mg/kg/dia.

### **3.3. Avaliação macroscópica e peso relativo dos órgãos**

Pela avaliação macroscópica dos órgãos, foi observado um animal com testículo muito pequeno, em relação ao restante do grupo e ao CN no ensaio de tratamento simultâneo, concentração de 50 mg/kg/dia. Porém, a diminuição encontrada neste indivíduo não interferiu na avaliação estatística, quando comparado ao CN (Tabela 4).

**Tabela 4:** Efeito do extrato nebulizado de cascas de *Ximenia americana* L. nos diferentes ensaios, sob o peso relativo dos órgãos de camundongos *Mus musculus*, após o período de experimentação

Ensaio	Concentrações	Baço	Coração	Fígado	Pâncreas	Pulmões	Rins	Testículo	Tireóide
Controles	CN	0,0028±0,0010	0,0040±0,0012	0,0380±0,0044	0,0042±0,0004	0,0046±0,0005	0,0100±0,0000	0,0040±0,0012	0,0050±0,0012
	CP	0,0030±0,0007	0,0042±0,0004	0,0360±0,0054	0,0046±0,0008	0,0056±0,0008	0,0100±0,0000	0,0048±0,0008	0,0060±0,0005
Pré-Tratamento	50mg/kg/dia	0,0028±0,0005	0,0040±0,0000	0,0366±0,0057	0,0046±0,0015	0,0046±0,0005	0,0100±0,0000	0,0056±0,0020	0,0060±0,0010
	150mg/kg/dia	0,0032±0,0008	0,0034±0,0005	0,0286±0,0151	0,0034±0,0013	0,0044±0,0005	0,0100±0,0000	0,0046±0,0005	0,0056±0,0008
	250mg/kg/dia	0,0032±0,0008	0,0042±0,0004	0,0400±0,0000	0,0042±0,0008	0,0050±0,0007	0,0100±0,0000	0,0052±0,0008	0,0056±0,0005
	350mg/kg/dia	0,0038±0,0004	0,0044±0,0005	0,0400±0,0000	0,0048±0,0017	0,0056±0,0005	0,0100±0,0000	0,0056±0,0011	0,0064±0,0008
Trat. Simultâneo	50mg/kg/dia	0,0032±0,0008	0,0042±0,0004	0,0380±0,0044	0,0044±0,0005	0,0066±0,0019	0,0100±0,0000	0,0046±0,0008	0,0056±0,0011
	150mg/kg/dia	0,0032±0,0008	0,0046±0,0008	0,0400±0,0000	0,0044±0,0005	0,0052±0,0004	0,0100±0,0000	0,0058±0,0010	0,0058±0,0008
	250mg/kg/dia	0,0034±0,0015	0,0046±0,0008	0,0340±0,0054	0,0046±0,0008	0,0040±0,0017	0,0100±0,0000	0,0050±0,0007	0,0062±0,0004
	350mg/kg/dia	0,0032±0,0004	0,0040±0,0007	0,0360±0,0054	0,0044±0,0005	0,0052±0,0008	0,0100±0,0000	0,0058±0,0023	0,0074±0,0020
Pós-Tratamento	50mg/kg/dia	0,0024±0,0005	0,0038±0,0004	0,0360±0,0054	0,0046±0,0008	0,0048±0,0004	0,0100±0,0000	0,0050±0,0044	0,0062±0,0008
	150mg/kg/dia	0,0028±0,0004	0,0044±0,0005	0,0380±0,0044	0,0046±0,0011	0,0050±0,0000	0,0100±0,0000	0,0046±0,0005	0,0066±0,0019
	250mg/kg/dia	0,0032±0,0004	0,0040±0,0006	0,0340±0,0054	0,0042±0,0004	0,0050±0,0010	0,0100±0,0000	0,0044±0,0005	0,0080±0,0027
	350mg/kg/dia	0,0042±0,0012	0,0037±0,0005	0,0450±0,0100	0,0042±0,0005	0,0050±0,0008	0,0100±0,0000	0,0047±0,0005	0,0075±0,0028
Trat. Contínuo	50mg/kg/dia	0,0034±0,0015	0,0044±0,0008	0,0360±0,0054	0,0050±0,0012	0,0050±0,0007	0,0100±0,0000	0,0056±0,0026	0,0060±0,0023
	150mg/kg/dia	0,0034±0,0015	0,0042±0,0016	0,0380±0,0148	0,0054±0,0015	0,0056±0,0013	0,0100±0,0000	0,0060±0,0023	0,0060±0,0014
	250mg/kg/dia	0,0036±0,0018	0,0042±0,0016	0,0360±0,0054	0,0050±0,0012	0,0052±0,0013	0,0100±0,0000	0,0048±0,0016	0,0064±0,0008
	350mg/kg/dia	0,0029±0,0004	0,0040±0,0000	0,0340±0,0054	0,0042±0,0008	0,0046±0,0005	0,0100±0,0000	0,0048±0,0004	0,0054±0,0011

CN: Controle negativo; CP: Controle positivo; Valores expressos em gramas (g) da média ± desvio padrão.

### **3.4. Avaliação do potencial anticarcinogênico e quimiopreventivo do extrato nebulizado de *X. americana* L. para câncer de cólon de camundongos *Mus musculus***

Para a análise de anticarcinogenicidade e de quimioprevenção do extrato nebulizado de *X. americana* L., foram analisados os intestinos dos animais experimentados, quanto à presença de focos de criptas aberrantes (FCA). Para esta análise, foi avaliado, microscopicamente, o intestino grosso, porção colorretal, de todos os grupos tratados e dos grupos controle (CN e CP).

Nesta análise, foram considerados os danos referentes ao aparecimento de FCA, subdivididos em focos com  $<3$  CA e  $>3$  CA. O número encontrado nesses parâmetros e a média total de FCA foram comparados estatisticamente com os resultados obtidos no CP, grupo este que recebeu a 1,2 dimetilhidrazina (DMH) com reconhecida ação carcinogênica (Tabela 5). Quando os grupos tratados foram comparados com grupo CP, foi observada uma diminuição significativa de FCA  $<3$ , para os tratamentos CN; Pré-tratamento, nas concentrações de 150 e 250 mg/kg/dia; Tratamento Simultâneo, na concentração de 50 mg/kg/dia e Tratamento contínuo, na concentração de 350 mg/kg/dia. Para FCA  $>3$ , foram observadas diminuição significativa para os tratamentos CN; Pré-tratamento, na concentração de 350 mg/kg/dia; Pós tratamento, na concentração de 50 mg/kg/dia e Tratamento contínuo, nas concentrações de 250 e 350 mg/kg/dia. Quando a média total de FCA (grupo tratado e CN) foram comparadas com os resultados do CP, foi observada uma diminuição estatisticamente significativa para os tratamentos CN, Pré-tratamento, nas concentração de 150, 250 e 350 mg/kg/dia; Tratamento simultâneo, nas concentrações de 50, 150 e 350 mg/kg/dia; Pós-tratamento na concentração de 50 e 150 mg/kg/dia e Tratamento contínuo, na concentração de 350 mg/kg/dia.

A porcentagem de redução de danos do extrato nebulizado de *X. americana* L. corroboram com o resultado encontrado na média total de FCA, citados acima. Nesta análise, foi possível encontrar uma redução de danos no Pré-tratamento de 98,33 % na concentração de 150 mg/kg/dia, 94,16% na concentração de 250 mg/kg/dia e 75 % na concentração de 350 mg/kg/dia; Tratamento simultâneo de 85,00 % na concentração de 50 mg/kg/dia, 75,00 % na concentração de 150 mg/kg/dia e 75,83% na concentração de 350 mg/kg/dia; no Pós-tratamento a redução foi de 80,00% na concentração de 50 mg/kg/dia e 77,50 % na concentração de 150 mg/kg/dia e no Tratamento contínuo de 87,50 % na concentração de 350 mg/kg/dia.

**Tabela 5:** Efeito anticarcinogênico e quimiopreventivo do extrato nebulizado de *X. americana* L., avaliado pelo ensaio de indução de Focos de Criptas Aberrantes (FCA) em porção colorretal do intestino de camundongos *Mus musculus*

Ensaio	Concentrações	Média de FCA		Total	%RD
		< 3	> 3		
Controles	CN	<b>9,60±5,32*</b>	<b>0,00±0,00**</b>	<b>4,80±5,32*</b>	-
	CP	30,2±7,22	3,40±3,90	16,8±15,1	-
Pré- tratamento	50 mg/kg/dia	15,0±4,35	0,66±0,57	7,83±8,32	74,75
	150 mg/kg/dia	<b>9,60±5,17*</b>	5,96±0,55	<b>5,00±5,96*</b>	<b>98,33</b>
	250 mg/kg/dia	<b>10,6±7,86*</b>	0,40±0,50	<b>5,50±7,51*</b>	<b>94,16</b>
	350 mg/kg/dia	15,6±12,4	<b>0,00±0,00**</b>	<b>7,80±12,4*</b>	<b>75,00</b>
Trat. Simultâneo	50 mg/kg/dia	<b>12,6±7,16*</b>	0,60±0,89	<b>6,60±7,94*</b>	<b>85,00</b>
	150 mg/kg/dia	15,4±8,96	0,20±0,40	<b>7,80±9,99*</b>	<b>75,00</b>
	250 mg/kg/dia	20,2±11,9	1,80±1,70	11,0±12,6	48,33
	350 mg/kg/dia	15,2±9,78	0,20±0,44	<b>7,70±9,79*</b>	<b>75,83</b>
Pós-Tratamento	50 mg/kg/dia	14,2±5,40	<b>0,20±0,44**</b>	<b>7,20±8,22*</b>	<b>80,00</b>
	150 mg/kg/dia	13,4±7,23	1,60±2,00	<b>7,50±7,98*</b>	<b>77,50</b>
	250 mg/kg/dia	18,8±5,40	0,80±0,44	9,80±10,1	58,33
	350 mg/kg/dia	22,7±4,42	1,00±1,40	11,9±12,0	41,08
Trat. Contínuo	50 mg/kg/dia	17,6±18,1	0,60±0,80	9,10±15,0	64,16
	150 mg/kg/dia	21,8±16,0	0,40±0,54	11,1±15,5	47,50
	250 mg/kg/dia	20,8±8,37	<b>0,00±0,00**</b>	10,4±12,3	53,33
	350 mg/kg/dia	<b>12,4±10,2*</b>	<b>0,20±0,44**</b>	<b>6,30±9,89*</b>	<b>87,50</b>

CN: Controle negativo; CP: Controle positivo; \* significativo quando comparado ao CP (Anova/Dunnet); \*\* significativo quando comparado ao CP (Kruskal-Wallis); p < 0,05.

### 3.5. Avaliação dos efeitos do extrato nebulizado de *X. americana* L. sobre células sanguíneas dos camundongos *Mus musculus*

Não houve diferença estatisticamente significativa na contagem diferencial de leucócitos, quando os resultados dos animais tratados com o extrato nebulizado de *X. americana* L. foram comparados com o CN (Tabela 6 e 7).

**Tabela 6:** Efeitos de diferentes concentrações do extrato nebulizado de *Ximenia americana* L., sobre células sanguíneas da 1<sup>o</sup> coleta, 24 horas antes do início do experimento, por meio do teste de contagem diferencial de leucócitos

Ensaio	Parâmetros	Linfócitos	Neutrófilos	Monócitos	Eosinófilos	Basófilos
	Val. De Ref. Concentrações	70-80%	20-30%	0-2%	0-7%	0-1%
Controles	CN	76,8±4,86	23,2±4,38	1,40±1,34	1,00±2,23	0,60±1,34
	CP	78,6±16,3	19,0±14,1	1,00±1,22	0,80±0,83	0,60±0,89
Pré-Tratamento	50mg/kg/dia	71,4±6,46	27,0±6,16	1,60±1,14	1,00±1,00	0,20±0,44
	150mg/kg/dia	71,4±9,86	26,2±9,01	0,60±0,89	0,60±0,89	0,80±1,09
	250mg/kg/dia	79,6±8,87	19,2±8,78	1,60±0,89	0,40±0,54	0,20±0,44
	350mg/kg/dia	80,0±7,96	17,8±6,68	1,00±1,73	0,80±1,78	0,20±0,44
Trat. Simultâneo	50mg/kg/dia	76,2±15,5	20,6±13,1	1,00±0,70	1,40±1,14	0,20±0,44
	150mg/kg/dia	74,8±9,88	20,2±5,31	0,80±1,30	0,20±0,44	0,20±0,44
	250mg/kg/dia	71,0±7,31	28,0±6,04	0,20±0,44	0,80±1,30	0,00±0,00
	350mg/kg/dia	75,0±13,8	23,0±11,6	1,20±1,78	0,80±1,30	0,20±0,44
Pós-Tratamento	50mg/kg/dia	82,0±7,71	16,2±6,41	2,00±0,44	1,40±2,07	0,40±0,54
	150mg/kg/dia	82,6±7,19	15,6±6,22	1,20±1,78	1,00±1,00	0,00±0,00
	250mg/kg/dia	79,0±10,4	18,0±6,96	2,00±3,39	1,00±0,70	0,20±0,44
	350mg/kg/dia	79,0±15,5	18,0±6,96	2,00±3,39	1,00±0,70	0,20±0,44
Trat. Contínuo	50mg/kg/dia	78,2±15,5	19,6±14,2	1,40±1,51	1,00±1,00	0,40±0,54
	150mg/kg/dia	76,6±13,0	20,6±10,8	1,60±1,40	1,60±3,04	0,00±0,00
	250mg/kg/dia	77,8±11,4	20,8±10,8	0,60±1,34	1,00±1,00	0,20±0,44
	350mg/kg/dia	85,8±5,16	12,6±4,50	0,20±0,40	1,40±1,51	0,00±0,00

CN: Controle Negativo; CP: Controle Positivo; Val. de ref.: valor de referência.

**Tabela 7:** Efeitos de diferentes concentrações do extrato nebulizado de *Ximenia americana* L., sobre células sanguíneas, da 2<sup>o</sup> coleta, após 24 h da última administração, antes da eutanásia, avaliadas pela contagem diferencial de leucócitos

Ensaio	Parâmetros	Linfócitos	Neutrófilos	Monócitos	Eosinófilos	Basófilos
	Val. De Ref.	70-80%	20-30%	0-2%	0-7%	0-1%
Concentrações						
Controles	CN	78,4±10,6	19,8±10,4	1,00±1,22	0,40±0,89	0,40±0,54
	CP	78,0±2,44	20,8±2,16	1,60±1,67	0,40±0,54	0,00±0,00
Pré-Tratamento	50mg/kg/dia	80,6±50,9	16,3±2,30	1,00±1,00	0,66±0,57	0,66±0,57
	150mg/kg/dia	82,6±5,77	15,6±6,42	1,20±0,83	0,60±0,54	0,20±0,44
	250mg/kg/dia	78,2±10,0	20,2±30,0	0,80±0,83	0,80±1,09	0,00±0,00
	350mg/kg/dia	77,8±7,91	18,6±5,36	1,80±1,48	1,80±1,64	0,00±0,00
Trat. Simultâneo	50mg/kg/dia	80,6±4,21	17,2±4,14	0,80±1,30	1,40±1,67	0,20±0,44
	150mg/kg/dia	75,8±16,3	20,8±16,0	1,40±1,14	1,40±0,89	0,60±0,54
	250mg/kg/dia	76,8±3,27	21,0±2,82	1,20±1,94	0,80±0,44	0,40±0,54
	350mg/kg/dia	85,0±7,48	13,4±7,70	3,80±4,26	0,20±0,44	0,20±0,44
Pós-Tratamento	50mg/kg/dia	76,8±5,01	20,4±3,91	2,00±1,87	0,60±0,89	0,40±0,89
	150mg/kg/dia	77,6±13,7	19,6±11,7	1,00±0,81	0,60±0,54	0,00±0,00
	250mg/kg/dia	73,6±6,97	21,4±6,38	1,60±1,14	1,40±0,89	0,20±0,44
	350mg/kg/dia	72,8±10,3	17,5±6,35	1,00±0,81	0,25±0,50	0,25±0,50
Trat. Contínuo	50mg/kg/dia	81,0±6,97	25,2±9,28	1,60±1,34	0,40±0,54	0,00±0,00
	150mg/kg/dia	77,6±8,53	20,2±5,71	0,60±0,89	1,20±1,30	0,60±1,34
	250mg/kg/dia	74,2±8,43	24,0±7,24	1,00±1,00	1,00±0,70	0,00±0,00
	350mg/kg/dia	75,6±7,76	22,8±7,98	0,80±1,30	0,80±0,83	0,20±0,44

CN: Controle Negativo; CP: Controle Positivo; Val. de ref.: valor de referência.

#### 4. Discussão e Conclusão

O Câncer colorretal é a terceira causa de morte entre os diferentes tipos de câncer em todo o mundo (WHO, 2018). Seus fatores etiológicos são múltiplos e, recentemente, a composição da microbiota intestinal tem sido apontada como mais um fator de risco para o desenvolvimento desse tipo de patologia (WU et al., 2013). Com isto, acredita-se que alguns alimentos ou plantas medicinais possam ser capazes de modular, positivamente, a composição desta microbiota.

O câncer de cólon pode ser induzido, em roedores, por diversos carcinógenos químicos diretos e indiretos (CARLI, 2011). A DMH (1,2-dimetilhidrazina) é uma substância carcinogênica que se liga diretamente ao DNA (NEWELL e HEDDLE, 2004; TANAKA, 2009), por isso utilizada em ensaios de carcinogenicidade. Essa droga,

considerada um carcinógeno completo, por induzir tanto a etapa de iniciação como de promoção, possui alta especificidade para o cólon de várias espécies de roedores (NEWELL e HEDDLE, 2004, TANAKA, 2009; FEMIA, 2010). É um dos carcinógenos mais utilizados em experimentação, devido à sua alta taxa de indução de tumores, que pode aparecer após uma dose única ou com uma série de pequenas doses semanais (KAMALEESWARI et al., 2006). Sua ativação metabólica ocorre no fígado, via CYP 2E1, e seus metabólitos são transportados, via sangue ou bile, para o intestino grosso, que é o principal alvo de sua ação (TANAKA, 2009). Os produtos do metabolismo da DMH induzem a formação de adutos de grupos metil, que agem provocando mutações de ponto no DNA, separação aberrante de cromátides irmãs e indução de apoptose no cólon, aumentando a proliferação de colonócitos (NEWELL e HEDDLE, 2004). Existem muitas similaridades entre os tumores humanos e os induzidos pela DMH, como, por exemplo, a cinética da proliferação celular (TANAKA, 2009). O modelo de câncer de cólon induzido pela DMH é considerado o mais indicado para se avaliar o potencial de um agente quimiopreventivo (CORPET e PIERRE, 2005).

As criptas aberrantes foram primeiramente descritas por Bird (1987), para cólon de roedores tratados com carcinógenos químicos. Elas podem ser identificadas na mucosa do cólon, como sendo criptas mais largas, espessas e mais escuras que as demais criptas intestinais, podendo ser únicas ou em forma de focos (TUDEK et al., 1989). Essas alterações são observadas, com muita frequência, no cólon médio e distal, tanto em roedores como em seres humanos acometidos pela polipose ou câncer de cólon, sendo então consideradas como precursoras da carcinogênese de cólon (DI GREGORIO et al., 1997; RODRIGUES et al., 2002; PRETLOW, 1991; ALRAWI, 2006). Os focos contendo quatro ou mais criptas aberrantes (FCA) de alta multiplicidade, são preditivos de uma eventual formação de tumor (TERZIC et al., 2010).

O extrato nebulizado de cascas de *X. americana* L. conseguiu reduzir a formação de FCA gerados pela DMH na porção colorretal do intestino grosso de camundongos, nos diferentes períodos testados e nas diferentes concentrações em que foram expostos. No pré-tratamento, onde os animais recebiam as diferentes concentrações do extrato nebulizado de *X. americana*, antes da indução da carcinogênese colorretal pela DMH, houve uma redução de danos, estatisticamente significativa, em três das quatro concentrações testadas, sendo mais eficaz nas mais altas concentrações (150, 250 e 350 mg/kg/dia), cujas reduções foram de 98,33, 94,16 e 75,00 %, respectivamente. Com esses resultados, podemos concluir que o extrato nebulizado de *X. americana* L. nas concentrações testadas, conseguiu proteger o



intestino do dano ocasionado pela DMH. No tratamento simultâneo, onde o DMH foi administrado junto ao extrato nebulizado de *X. americana* L., também houve promoção de redução do percentual dos danos, sendo mais eficaz nas concentrações de 50, 150 e 350 mg/kg/dia, cujas reduções foram de 85,00, 75,00 e 75,83 %, respectivamente. Por esses resultados, podemos concluir, para estas concentrações testadas, que o extrato nebulizado de *X. americana* apresentou um efeito quimiopreventivo contra o DMH. No pós-tratamento, onde o extrato nebulizado de *X. americana* L. foi administrado nos animais, após a indução da carcinogênese colorretal (DMH), houve uma redução de danos mais eficaz nas concentrações de 50 e 150 mg/kg/dia, o que correspondeu a 80,00 e 77,50 %, respectivamente. Neste caso, também podemos concluir que, nestas concentrações testadas, o extrato nebulizado de *X. americana* L. conseguiu reparar o dano ocasionado pela DMH. No tratamento contínuo, onde o extrato nebulizado de *X. americana* L. foi administrado por todo período experimental, houve uma redução dos danos maior para a concentração de e 350 mg/kg/dia, reduzindo 87,50 % deles, com esse resultado, podemos concluir que, quando o extrato nebulizado de *X. americana* L. foi administrado por um período crônico, a redução de danos ocorreu apenas na maior concentração testada. Sendo assim, diante de todos os resultados de redução de danos promovidos pelo DMH, obtidos nos tratamentos de anticarcinogenicidade realizados, o extrato nebulizado de *X. americana* L. teve um excelente efeito quimiopreventivo, para a carcinogênese colorretal.

Esse efeito quimiopreventivo pode estar associado com composição química do extrato nebulizado de *X. americana* L. Estudos fitoquímicos realizados com o extrato nebulizado de *X. americana* L., detectaram a presença de polifenóis, taninos condensados e flavonoides como ácido gálico, epicatequina, catequina, quercetina, ligninas, monoterpênos, sesquiterpênos, diterpênos, naftoquinonas, triterpênos e esteroides. Também foram encontradas quantidades pequenas de alcalóides, saponinas e tanino hidrolisável. (BRANDÃO et al, 2014; ARAGÃO et al., 2018; SANTANA et al., 2018). Uchôa et al. (2016), em seus estudos com o mesmo extrato, também encontraram uma alta atividade antioxidante, que os autores associam à presença de polifenóis no extrato. A atividade benéfica desses diferentes compostos presentes em plantas já é bem descritos na literatura. O ácido gálico, por exemplo, um componente encontrado em maior abundância no presente extrato, apresenta forte ação antioxidante (KIM et al., 2002), anti-inflamatória (KROES e VAN DEN BERGER, 1992; YADAV et al., 2018), antimutagênica (GICHNER et al., 1987) e antitumoral (LOCATELLI et al., 2013). Com relação à atividade antitumoral, o ácido

gálico tem demonstrado também atividade citotóxica seletiva, afetando, principalmente, as células tumorais e não as linhagens celulares normais (SERRANO et al., 1998; YOSHIOKA et al., 2000).

Os animais tratados com o extrato nebulizado de cascas de *X. americana* L., os do grupo CN e CP tiveram um alto ganho de peso, durante as 12 semanas de experimento, o que significa que esse ganho não foi induzido pelo extrato estudado, uma vez que os resultados entres esses grupos não mostraram, quando avaliados estatisticamente ao CN, diferenças significativas. Na avaliação macroscópica dos órgãos, foi observado no grupo de tratamento simultâneo (concentração de 50 mg/kg/dia) um animal com testículo muito pequeno, em relação aos outros animais do seu grupo e do CN. A diminuição de testículos de ratos Wistar foi também encontrada por Abubakar e Salka (2011), quando esses autores avaliaram o extrato de *X. americana*. Como o peso relativo dos órgãos dos grupos tratados não foi estatisticamente diferente, do grupo CN, podemos inferir que o extrato nebulizado de *X. americana* L., nos períodos testados, não produziu efeito tóxico nos órgãos avaliados de camundongo *M. musculus*. Desta forma, como não foram observados alterações desses parâmetros nos animais tratados com o extrato estudado, podemos afirmar que esse extrato não apresenta potencial tóxico.

A contagem diferencial de leucócitos não apresentou resultado estatisticamente significativo, nas duas coletas realizadas, quando comparadas com os dados do CN. Esses resultados corroboram com os encontrados na avaliação da anticarcinogenicidade colorretal, onde o extrato nebulizado de *X. americana* L. não induziu carcinogenicidade nos animais tratados, ou foi capaz de reparar os efeitos inflamatórios ocasionados pela DMH no intestino desses animais. A resposta imune e o estado inflamatório subsequente são regulados por uma interação complexa entre o próprio organismo e o seu microbioma hospedeiro (micróbios residentes). Desregulação da resposta imune e disbiose (desequilíbrio no hospedeiro microbioma), isoladamente ou em combinação, pode levar a uma resposta inflamatória (SNAPPER e ABRAHAM, 2016). Acredita-se que a disbiose desempenha um papel importante em doenças relacionadas a órgãos como o intestino (JOHNSTON, 2017). Fatores ambientais, tais como a dieta, têm sido relatada como capazes de desenvolver inflamação intestinal (HAMMER et al., 1990; RATH et al., 1996). No intestino, as manifestações microscópicas do estado inflamatório incluem liberação e recrutamento de fatores, como as numerosas células do sistema inato e adaptativo do sistema imunológico, citocinas e prostaglandinas (SNAPPER e ABRAHAM, 2016). Essa continuação imprópria do estado

inflamatório pode levar à carcinogênese colorretal (COUSSENS, 2002). O microambiente tumoral inflamatório é considerado uma característica chave para o estabelecimento do câncer ou para a sobrevivência de células cancerígenas (HANAHAN e WEINBERG, 2011). Estudos mostram que em lesões pré-neoplásicas de câncer de cólon há um aumento dos níveis da ciclooxigenase-2, enzima que catalisa a produção de prostaglandinas associadas ao processo inflamatório, enquanto a redução dos níveis dessa enzima apresenta um efeito preventivo contra o desenvolvimento de câncer de cólon (OSHIMA et al., 1996; KAWAMORI et al., 1998).

Até o presente momento não se tem na literatura estudos sobre o efeito quimiopreventivo em cólon de animais, avaliados pela redução da formação de FCA. Assim, sendo FCA a primeira alteração observada no cólon que pode resultar em câncer colorretal, a formação de uma única célula pré-neoplásica, denominada de cripta aberrante (CA), pode progredir para um conjunto de lesões pré-neoplásicas (FCA), que são consideradas marcadores do câncer de cólon e muito utilizados em estudos experimentais de quimioprevenção (CORPET e PIERRE, 2005; FEMIA, 2010).

Alguns estudos foram realizados com diferentes tipos de extratos de *X. americana* L., obtidos de diferentes partes da planta em algumas linhagem celulares de câncer. Voss et al., (2006) avaliaram o efeito do extrato aquoso de *X. americana* L. em células de câncer de cólon de rato (CC531) e observou uma atividade antineoplásica para o extrato. Os estudos desenvolvidos por Kabran et al., (2017) como o extrato hidroacetônico de *X. americana* L. revelaram um efeito anticarcinogênico para linhagens celulares cancerígenas, com um resultado bastante positivo para a linhagem de intestino humano (CaCo-2). Os autores ainda destacam que esse efeito deve ser devido a presença de compostos fenólicos presentes no extrato, tais como taninos e flavonoides. Le et al., (2012) encontrou efeito antioxidante em extrato etanólico das folhas de *X. americana* L. em inibidores de xantina oxidase e 15-Lipoxigenase, sendo um promissor preventivo de doenças isquêmicas, cardiovasculares e inflamatórias. Os autores acreditam que esses efeitos anti-inflamatórios sejam devido aos compostos fenólicos presentes no extrato estudado, tais como, flavonóides, taninos, ácido gálico, glicosídeos cardiotônicos e quercetina.

Estudos fitoquímicos realizados com o extrato nebulizado de *X. americana*, L. encontraram polifenóis como taninos condensados, flavonoides, ácido gálico, epicatequina, catequina, quercetina, lignanas, monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, naftoquinonas, triterpenos e esteróides, e quantidades pequenas de alcalóides, saponinas e tanino

hidrolisável. (MAIKAI et al., 2008; BRANDÃO et al, 2014; ARAGÃO et al., 2018; SANTANA et al., 2018). Pelos componentes químicos presentes no extrato nebulizado de *X. americana* L. e pelos efeitos positivos registrados neste estudo, quanto a anticarcinogenicidade do extrato e a não toxicidade do mesmo para camundongos, acreditamos que os compostos fenólicos presentes neste extratos conferem ao mesmo um potencial quimioprotetor e quimiopreventivo, que minimizam efeitos adversos de compostos carcinogênicos, como o DMH.

## 5. Referências Bibliográficas

ALVES, R. R. N., Utilização e comércio de plantas medicinais em Campina Grande, PB, Brasil., *Electronic Journal of Pharmacy*, v.4, n.2, 2007.

ALRAWI, S. J. et al. Genomic instability of human aberrant crypt foci measured by inter-(simple sequence repeat) PCR and array-CGH. *Mutat Res*, v. 601, n. 1-2, p. 30-8, Oct 10 2006.

ARAGÃO, T. P; PRAZERES, L. D. K. T; BRITO, S. A; NETO, P. J. R; ROLIM, L. A; ALMEIDA, J. R. G. S; CALDAS, G. F. R; WANDERLEY, A. G. Contribution of Secondary Metabolites to the Gastroprotective Effect of Aqueous Extract of *Ximenia americana* L. (Olacaceae) Stem Bark in Rats, *Molecules*, 23, 112, 2018.

BIRD, R. P., Observation and quantification of aberrant crypts in the murine colon treated with a colon carcinogen: preliminary findings. *Cancer Lett.* v.37, n.2, p. 147-51, 1987.

BOYLE, P., LEON, M. E., Epidemiology of colorectal cancer. *Br med bull*, v.64, p.1-25, 2002.

BRANDÃO, D. O., Desenvolvimento de uma formulação de uso intracanal com atividade antimicrobiana obtida a partir de uma planta do semiárido brasileiro (2014). Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual da Paraíba. 130p.

BURKILL H., *Royal Botanic gardens. Surrey*, p. 264-266, 1997.

CORPET DE, PIERRE F., How good are rodent models of carcinogenesis in predicting efficacy in humans? A systematic review and meta-analysis of colon chemoprevention in rats, mice and men. *Eur J Cancer*. v.41,n.13, p.1911-1922, 2005.

DI GREGORIO, C., LOSI, L., FANTE, R., MODICA, S., GHIDONI, M., PEDRONI, M., TAMASSIA, M. G., GAFA, L., PONZ DE LEON, M., RONCUCCI, L., Histology of aberrant crypt foci in the human colon, *Histopathology*, v.30, p.328-334, 1997.

DIAS, A. P. T. P., Gollner, A. M., Teixeira, M. T. B., Colorectal cancer-screening, prevention and control., *HU rev, Juiz de Fora*, v.33, n.4, p.125-131, 2007.

FEMIA, A. P., TARQUINI, E., SALVADORI, M., FERRI, S., GIANNINI, A., DOLARA,

P., CADERNI, G., K-ras mutations and mucin profile in preneoplastic lesions and colon tumors induced in rats by 1,2-dimethylhydrazine. *Int. J. Cancer*, v.122, n.1, p.117-23, 2008.

FERGUSON, L. R., CHEN H. H., COLLINS, A. R., “Genomic instability in human cancer: molecular insights and opportunities for therapeutic attack and prevention through diet and nutrition,” *Seminars in Cancer Biology*, v. 35, p. 5-24, 2015.

FRANCO, E. A. P., BARROS, R. F. M., Uso e diversidade de plantas medicinais no Quilombo Olho D água dos Pires, Esperantina, Piauí. *Rev Bras Plant Med* v.8, p.78-88, 2006.

P. FRESCO, P., BORGES, F., DINIZ, C., MARQUES, M. P. M., “New insights on the anticancer properties of dietary polyphenols,” *Medicinal Research Reviews*, v. 26, n. 6, p. 747-766, 2006.

GRONHAUG, T. E., GLÆSERUD, S., SKOGSRUD, M., BALLO, N., BAH, S., DIALLO, D., PAULSEN, B. S., Ethnopharmacological survey of six medicinal plants from Mali, West-Africa. *J. Ethnobiol. Ethnomed.* n.26, v.4, p.1-11, 2008.

Instituto Nacional do Câncer (INCA), Estimativas da incidência de câncer no Brasil 2018. Disponível em <http://www.inca.gov.br/estimativa/2018>. Acesso em julho de 2018.

JOHNSTON, R. B. J., An overview of the innate immune system. UpToDate, 2017.

JAMES, D. B., ABU, E. A., WUROCHEKKE, A. U., ORGI, G. N. Phitochemical and Antimicrobial investigation of the aqueous and methanolic extracts of *Ximenia americana*. *Journal of Medical Science, Zaria*, v.7, n. 2, pp. 284-288, 2007.

KABRAN, G. M. R., MAMYRBEKOYA-BEKRO, J. A., PIRAT, J. L., LECOUCVEY, M., SAINTE, -CATHÉRINE, O., SOMMERER, N., BEKRO, Y. A. UPLC-MS. Quantification and anticancer potencial of and *Ximenia americana* hidroacetonic, crude extract leaves. *Der Chemica Sinica*, v.8, n.1, 2017.

KAMALEESWARI, M., TUVELAN, M., NALINI, N., Effects of dietary caraway (*Carum carvi* L.) on aberrant crypt foci development, fecal steroid, and intestinal alkaline phosphatase activities in 1,2- dimethylhydrazine- induced colon carcinogenesis. *Toxicol Appl Pharmacol.*, v.214, n.3, p.290-296, 2006.

KIM, Y. K., GUO, Q., PACKER, L., Free radical scavenging activity of red ginseng aqueous extracts. *Toxicology*, v. 172, p. 149-156, 2002.

KROES, B.H., VAN DEN BERG, A. J. J., VAN UFFORD, H. Q., VAN DIJK, H., LABADIE, R. P., Anti-inflammatory activity of gallic acid. *Planta Med.* n.58, p.499-504, 1992.

LE, N. H. T., MALTERUD, K. E., DIALLO, D., PAULSEN, B. S., NERGÅRD, C. S., WANGENSTEEN, H., Bioactive polyphenols in *Ximenia americana* and the traditional use among Malian healers., *Journal of Ethnopharmacology.* n.139, p. 858- 862, 2012.

MAIKAI, V. A., *KOBO, P.I., ADAUD, A.O.*, Acute toxicity studies of aqueous stem bark

extract of *Ximenia Americana.*, African Journal of Biotechnology, v. 7, n.10, 2008.

MAURO, M. O., Avaliação dos efeitos antígeno-tóxicos, antimutagênicos e anticarcinogênicos do frutooligosacarídeo inulina in vivo. Trabalho de Conclusão de Curso. Unifil – Londrina – Paraná. 2008.

MORAIS, S. M., DANTAS, J. D. P., SILVA, A. R. A., MAGALHÃES, E., Plantas medicinais usadas pelos índios Tapebas do Ceará. Revista Brasileira de Farmacognosia., João Pessoa, v. 15., n. 2, p.167-177, 2005.

MORSE, M. A., STONER, G. D. , “Cancer chemoprevention: Principles and prospects,” Carcinogenesis, v. 14, n. 9, p. 1737-1746, 1993.

NEWELL, L. E., HEDDLE, J. A., The potent colon carcinogen, 1,2- dimethylhydrazine induces mutations primarily in the colon. Mut Res. n.564, v.1, p.1-7, 2004.

OGUNLEYE, D. S., IBITOYE., TROP, S. F., Studies of antimicrobial activity and chemical constituents of *Ximenia americana.* Journal of Pharmaceutical Research, v. 2, n. 2, p. 239-241, 2003.

OLIVEIRA, F. C. S., BARROS, R. F. M., MOITA NETO, J. M., Plantas medicinais utilizadas em comunidades rurais de Oeiras, semiárido piauiense. Revista Brasileira de Plantas Medicinais. n.12, v.3 p.282-301. 2010.

PERVAIZ, A., ADWAN, H., BERGER, M. R. Riproximin: A type II ribosome inactivating protein with antineoplastic potential induces IL24/MDA7 and GADD genes in colorectal cancer cell lines. Int. J. Oncol. n.47, p.981-990, 2015.

PRETLOW, T. P., O’RIORDAN, M. A., KOLMAN, M. F., JURCISEK, J. A., Colonic aberrant crypts in azoximethanetreated F344 rats have decreased hexosaminidase activity. Am. J. Pathol., n.136, v.13-26, 1990.

RODRIGUES, M. A. M., SILVA, L. A. G., SALVADORI, D. M. F., CAMARGO, J. L. V., MONTENEGRO, M. R., Aberrant crypt foci and colon cancer: comparison between a short- and medium term bioassay for colon medium-term bioassay for colon carcinogenesis using dimethylhydrazine in Wistar rats. Braz J. Med. Biol. Res. n.35, v.351-355, 2002.

ROQUE, A. A., ROCHA, R. M., LOIOLA, M. I. B., Uso e diversidade de plantas medicinais da Caatinga na comunidade rural de Laginhas, município de Caicó, Rio Grande do Norte (nordeste do Brasil), Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu, v.12, n.1, p.31-42, 2010.

SANDLER, R. S. Epidemiology and risk factors for colorectal cancer. Gastroenterol Clin North Am, Philadelphia, v.25, n.4, p.717-735, 1996.

SANTANA, C. P., MEDEIROS, F. D., CORREIA, L. P. DINIZ, P.H. G. D., VEÂRAS, G., MEDEIROS, A. C. D., Dissolution and uniformity of content oftablets developed with extract of *Ximeniaamericana L.*, PLoS ONE, v.13, n.5, 2018.

SNAPPER, S. B., ABRAHAM, C., Immune and microbial mechanisms in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. UpToDate.2016.

SULEMAN, S., TUFAA, T. B., KEBEBEA, D., BELEWA, SILESHI., MEKONNENA, Y., GASHEB, F, MUSSAB, S., WYNENDAELEC, E., DUCHATEAUE, L., SPIEGELEER, B., Treatment of malaria and related symptoms using traditional herbal medicine in Ethiopia, *Journal of Ethnopharmacology*, v.213, p. 262-279, 2018.

TANAKA, T., Colorectal carcinogenesis: Review of human and experimental animal studies. *Journal of Carcinogenesis*, n.8, v.5, 2009.

TERZIC, J. et al. Inflammation and colon cancer. *Gastroenterology*, v.138, n.6, p. 2101-2114, 2010.

TUDEK, B., BIRD, R. P., BRUCE, E., Foci of aberrant crypts in the colons of mice and rats exposed to carcinogens associated with foods. *Cancer Res.*, n.49, 1236-1240, 1989.

VOSS, C., EYOL, E., BERGER, M. R., Identification of potent anticancer activity in *Ximenia americana* aqueous extracts used by African traditional medicine. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v.211, p.177-178, 2006.

WANG., P., WANG, B., CHUNG,S., WU,Y., HENNING,S. M., VADGAMA J.V.,Increased chemopreventive effect by combining arctigenin, green tea polyphenol and curcumin in prostate and breast cancer cells., *RSC Advances.*, v. 66., 2014.

WU. X., HAWK, S. P. E., Chemoprevention – History and general principles., *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology.*,v.25, n.4, p. 445-459, 2011.

YADAV. M., JINDAL, D. K., DHINGRA, M. S., KUMAR A., PARLE, M., DHINGRA, S., Protective effect of gallic acid in experimental model of ketamine-induced psychosis: possible behaviour, biochemical, neurochemical and cellular alterations., *Inflammopharmacol*, n.26, p.413-424, 2018.

## 6. CONCLUSÕES GERAIS

De acordo com os resultados obtidos no presente estudo, sobre os efeitos tóxicos, quimioprotetores e quimiopreventivos de diferentes concentrações do extrato nebulizado da casca do caule de *Ximenia americana* L., sobre camundongos (*Mus musculus*), linhagem Swiss, podemos concluir:

- A toxicidade aguda, avaliada nas concentrações de 50, 250, 500 e 2000 mg/kg, o extrato de nebulizado da casca do caule *X. americana*, não induziu letalidade dos indivíduos, para a maior concentração estudada (2000 mg/kg), o que indica que extrato testado tem baixa toxicidade, se enquadrando então na Classe 5 das substâncias com DL50 superior a 2000 mg/kg, conforme sugere o guia OECD 423/2001. Na avaliação do peso relativo dos órgãos dos animais tratados com o extrato nebulizado de *X. americana*, ocorreu uma diminuição de todos os órgãos dos animais (coração, fígado, pâncreas, pulmões, rins, testículos e tireoide), indicando um possível dano. Os efeitos observados podem ter sido desencadeados pela presença de fitoquímicos no extrato, tais como polifenóis, taninos e flavonoides, que são compostos, que podem induzir efeitos pró-oxidantes na célula.
- Na avaliação da toxicidade subaguda, realizada de acordo com as orientações do guia OECD 407/2008 - doses repetidas, o extrato nebulizado da casca do caule de *X. americana*, nas concentrações de 150, 250 e 350 mg/kg/dia, no período de 28 dias de tratamento, não apresentou sinais de toxicidade para camundongos, porém, ocorreu a morte de um indivíduo na maior concentração testada (350 mg/kg/dia). Neste período de experimentação e concentrações avaliadas, o extrato de nebulizado *X. americana* não apresentou potencial citotóxico e mutagênico.
- Na avaliação da toxicidade crônica, (OECD 452/2009) e da carcinogenicidade de cólon, o extrato nebulizado da casca do caule de *X. americana*, não apresentou sinais de toxicidade, citotoxicidade ou de mutagenicidade em medula óssea e carcinogenicidade de cólon, quando camundongos da linhagem Swiss foram expostos às concentrações de 50, 150, 250 e 350 mg/kg/dia, por um período de 12 semanas (84 dias) de tratamento.



- Na avaliação da anticarcinogenicidade de cólon, o extrato nebulizado da casca do caule de *X. americana* nas concentrações de 50, 150, 250 e 350 mg/kg/dia, período de 12 semanas (84 dias) de tratamento apresentou um efeito quimioprotetor e quimiopreventivo de cólon em camundongos *Mus musculus*. Este efeito foi avaliado pela redução de danos colorretal, que foi induzido pela 1,2-dimetilhidrazina (DMH), por meio da contagem de focos de criptas aberrantes (FCA).
- Pelos resultados obtidos neste estudo, podemos inferir que o extrato nebulizado da casca do caule *X. americana* possui baixa toxicidade e um efeito não citotóxico e mutagênico, além de não induzir carcinogênese colorretal, em uso crônico, nas concentrações avaliadas 50, 150, 250 e 350 mg/kg/dia,. Foi observado também que, nestas mesmas concentrações, o extrato apresentou um efeito quimioprotetor e quimiopreventivo para câncer de cólon.
- Todo o estudo foi realizado com camundongos *Mus musculus* machos, e os efeitos quimioprotetor e quimiopreventivo foram investigados em intestino porção colorretal.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ALBERTS, D. S., MARTÍNEZ, M. E., ROE, D.J., GUILLÉN-RODRÍGUEZ, J. M., MARSHALL, J. R., VAN LEEUWEN, J. B., REID, M. E., RITENBAUGH, C., VARGAS, P. A., BHATTACHARYYA, A. B., Lack of effect of a high-fiber cereal supplement on the recurrence of colorectal adenomas. Phoenix Colon Cancer Prevention Physicians Network. N Engl J Med. 342, p.1156-1162, 2000.

ALMEIDA, M. L. B., FREITAS, W. E. S., MORAIS, P. L. D., SARMENTO, J. D. A., ALVES, R.E., Bioactive compounds and antioxidant potential fruit of *Ximenia americana* L. Food Chem. 192, p.1078-1082, 2016.

ALMEIDA NETO, X. J., MEDEIRO, F. P. M., MELO, A. J. M., SILVA, J. C., DANTAS, J. P., Avaliação do efeito mutagênico da palma forrageira (*Opuntia fícus-indica* Mill) através do teste do micronúcleo em medula óssea de ratos (*Rattus norvegicus*, Linhagem Wistar) in vivo. Revista de Biologia e Ciência da Terra, v. 5, n. 2, p. 1-11, 2005.

ALRAWI, S. J., CARROLL, E. R., HILL, H. C., GIBBS, J. F., TAN, D., BRENNER, B. M., NOWAK, N. J., SWEDE, H., STOLER, L., ANDERSON, G. R., Genomic instability of human aberrant crypt foci measured by inter-(simple sequence repeat) PCR and array-CGH. Mutat Res, v. 601, n. 1-2, p. 30-8, 2006.

ALVES, R. R. N., Utilização e comércio de plantas medicinais em Campina Grande, PB, Brasil., Eletronic Journal of Pharmacy, v.4, n.2, 2007.

AMES, B. N, SHIGENAGA, M., HAGEN, T., Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. Proc Natl Acad Sci ; v. 90, n.17, p. 7915-7922, 1993.

AMES, B. N., GOLD, L. S., Paracelsus to parascience: the environmental cancer distraction. Mutat. Res. Amsterdam, v.447, p. 3-13, 2000.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária RDC n. 10, de 9 de Março de 2010. Dispõe sobre a notificação de drogas vegetais junto à Agência Nacional de Vigilância Sanitária e dá outras providências. Diário Oficial da União. Brasília, 10 de Março de 2010.

ARAGÃO, T. P., PRAZERES, L. D. K. T., BRITO, S. A., NETO, P. J. R., ROLIM, L. A., ALMEIDA, J. R. G. S., CALDAS, G. F. R., WANDERLEY, A. G., Contribution of Secondary Metabolites to the Gastroprotective Effect of Aqueous Extract of *Ximenia americana* L. (Olacaceae) Stem Bark in Rats, Molecules, 23, 112, 2018.

ASRES, K., BUCAR, F., DE CLERCQ, E., KARTNIG, T., PANNECOUQUE, C., Antiviral activity against human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) and type 2 (HIV-2) of ethnobotanically selected ethiopian medicinal plants. Phytother15, p. 62-69, 2001.

BAGATINI, M. D., SILVA, A. C. F., TEDESCO, S. B., Uso do sistema teste de *Allium cepa* como bioindicador de genotoxicidade de infusões de plantas medicinais, Revista Brasileira de Farmacognosia, v.17, n. 3, p. 444-447, 2007.

BANERJEE, N., Pomegranate polyphenolics suppressed azoxymethane-induced colorectal aberrant crypt foci and inflammation: possible role of miR-126/VCAM-1 and miR126/PI3K/AKT/mTOR. *Carcinogenesis*, v. 34, n. 12, p. 2814-2822, 2013.

BARTH, S. W., Cloudy apple juice decreases DNA damage, hyperproliferation and aberrant crypt foci development in the distal colon of DMH-initiated rats. *Carcinogenesis*, v. 26, n. 8, p. 1414-1421, 2005.

BENOIT, F., VALENTIN, A., PELISSIER, Y., DIAFOUKA, F., MARION, C., In vitro antimalarial activity of vegetal extracts used in West African traditional medicine. *Am. J. Trop Med Hyg* 54, p. 67-71, 1996.

BERG, J. M. T., LUBERT, J., *Bioquímica*. 6.Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 545p. 2008.

BIRD, R. P., Observation and quantification of aberrant crypts in the murine colon treated with a colon carcinogen: preliminary findings. *Cancer Lett.* v.37, n.2, p. 147-51, 1987.

BIRD, R. P., Role of aberrant crypt foci in understanding the pathogenesis of colon cancer. *Cancer Lett.* v. 93, n.1, p.55-71, 1995.

BLAUT, M., SCHOEFER, L., BRAUNE, A., Transformation of flavonoids by intestinal microorganisms. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, v.73, p.79-87, 2003.

BONONI, A. P., CAETANO, C. S., ROCHA, N. S., OLIVEIRA, S. V., SALVADORI, D.M. F., CAMARGO, J. L. V., Lesões da bexiga e do cólon de ratos Wistar submetidos à carcinogênese química de duas etapas, *Rev. Bras. Cancerol.* v.45, n.4, p.13-24, 1999.

BURKILL H., *Royal Botanic gardens. Surrey*4, p. 264-266, 1997.

BURNET, F. M., The concept of immunological surveillance. *Prog Exp Tumor Res*, v. 13, p.1-27, 1970.

BRASILEIRO, M. T., EGITO, A. A., LIMA, J. R., RANDAU, K. P., PEREIRA, G. C., NETO, P. J., *Ximenia americana* L. botânica, química e farmacologia no interesse da tecnologia farmacêutica. *Rev. Bras. Farmacogn.* 2, p.164-167, 2008.

CAIRNS, J., Mutation selection and the natural history of cancer. *Nature*, v.255, n.5505, p.197-200, 1975.

CALIXTO, J. B., SCHEIDT, C., OTUKI, M., SANTOS, A. R., Biological activity of plant extracts: novel analgesic drugs. *Expert Opin Emerg Dr*, 2, p.261-279, 2001.

CAMPOS, N. A., Ação quimiopreventiva do tucum-do-cerrado (*Bactris setosa* Mart.) no desenvolvimento de criptas aberrantes no cólon de ratos tratados com azoximetano (2017) Tese de doutorado apresentada à Universidade de Brasília, Programa de Pós-graduação em nutrição humana, 101p.

CHAMPEET, P. C., HARVEY, R. A., FERRIER, D. R., Bioquímica Ilustrada. 4. Ed. Porto Alegre: Artmed, 533p. 2008.

COLUSSI, D., BRANDI, G., BAZZOLI, F., RICCIARDIELLO, L., Molecular Pathways Involved in Colorectal Cancer: Implications for Disease Behavior and Prevention. *Int. J. Mol. Sci.* 14, p.16365-16385, 2013.

COOPER, G. M., *The Cell: A Molecular Approach*. 2. Sunderland: Sinauer Associates, 2000.

CORPET DE, PIERRE F., How good are rodent models of carcinogenesis in predicting efficacy in humans? A systematic review and meta-analysis of colon chemoprevention in rats, mice and men. *Eur J Cancer*. v.41,n.13, p.1911-1922, 2005.

CORRÊA, C. C., ALVES, A. F., Plantas medicinais como alternativa de negócios: caracterização e importância. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ECONOMIA, ADMINISTRAÇÃO E SOCIOLOGIA RURAL, XLVI., Rio Branco. Anais XLVI Congresso da SOBER. Rio Branco: SOBER, p.189-207, 2008.

CHITARRA, M. I. F., CHITARRA, A. B., Pós-colheita de frutas e hortaliças: fisiologia e manuseio 2 ed. Lavras: UFLA, Cap.8, 2005.

CLIFFORD, M. N., KNIGHT, S., The cinnamoyl–amino acid conjugates of green robusta coffee beans, *Food Chem.* 87, p.457-463, 2004.

CRAFT, B. D., KERRIHARD, A. L., AMAROWICZ, R., PEGG, R. B., Phenol-based Antioxidants and the *In Vitro* Methods Used for Their Assessment., v.11, n.2, p.148-173, 2012.

DE FLORA, S., IZZOTTI, A., RANDEPATH, K., RANDEPATH, E., BARTSCH, H., NAIR J., DNA adducts in chronic degenerative diseases. Pathogenic relevance and implications in preventive medicine. *Mutat. Res.* v.366, p.197-238, 1996.

DE FLORA, S., Mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. *Mutat. Res.* v.402, p.151-158, 1998.

DE GROOT, D. J. A., VRIES, E. G. E., GROEN, H. J. M., JONG, S., Non-steroidal anti-inflammatory drugs to potentiate chemotherapy effects: from lab to clinic. *Crit Rev Oncol Hematol*, v.61, n.1, p.52-69, 2007.

DE VISSER, K. E., EICHTEN, A., COUSSENS, L. M., Paradoxical roles of the immune system during cancer development. *Nat Rev Cancer*, v.6, n.1, p.24-37, 2006.

DI GREGORIO, C., LOSI, L., FANTE, R., MODICA, S., GHIDONI, M., PEDRONI, M., TAMASSIA, M. G., GAFA, L., PONZ DE LEON, M., RONCUCCI, L., Histology of aberrant crypt foci in the human colon, *Histopathology*, v.30, p.328-334, 1997.

EDELMANN, L., EDELMANN, W., Loss of DNA mismatch repair function and cancer predisposition in the mouse: animal models for human hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Am. J. Med Genet C Semin Med Genet.* v.129, p.91-99, 2004.

EGEBLAD, M., NAKASONE, E. S., WERB, Z., Tumors as organs: complex tissues that interface with the entire organism. *Dev Cell*, v.18, n.6, p.884-901, 2010.

EHRlich, P., Ueber den jetzigen Stand der Karzinomforschung. *Ned. Tijdschr. Geneesk.*, v.5, p.273-290, 1909.

EROMOSELE, C. O., EROMOSELE, I. C., Fatty acid compositions of seed oils of *Haematostaphis barteri* and *Ximenia americana*. *Bioresource Technology*. v.82, n.3, p. 303-304, 2002.

DEGÁSPARI, C. H., WASZCZYNSKYJ, N., Antioxidants properties of phenolic compounds., *Visão Acadêmica, Curitiba*, v.5, n.1, p.33-40, 2004.

FARIAS, E. M. F. G., Avaliação da toxicidade aguda do extrato metanólico de folhas de *Lippia sidoides* Cham. (Verbenaceae) In: CONGRESSO BRASILEIRO DE QUÍMICA. Sociedade Brasileira de Química, Natal, 2007.

FEARON, E. R., VOLGELSTEIN, B., A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*. v.61, p.759-767, 1990.

FEMIA, A. P., TARQUINI, E., SALVADORI, M., FERRI, S., GIANNINI, A., DOLARA, P., CADERNI, G., K-ras mutations and mucin profile in preneoplastic lesions and colon tumors induced in rats by 1,2-dimethylhydrazine. *Int. J. Cancer*, v.122, n.1, p.117-23, 2008.

FERGUSON, L. R., PHILPOTT, M., KARUNASINGHE, N., Dietary cancer and prevention using antimutagens. *Toxicol*, v.198, p. 147-159, 2004.

FIGUEIREDO, F. R. G., Ensaio mutagênico em decocto de *Cochlospermum regium* (Mart. et. Schr.) Pilger (Bixaceae) em *Poecilia reticulata* e linfócitos humanos (2012). Dissertação de Mestrado em Ciências Ambientais e Saúde, Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Goiânia, 115p.

FISHER, D. T., APPENHEIMER, M. M., EVANS, S. S., The two faces of IL-6 in the tumor microenvironment. *Semin Immunol*, v.26, n.1, p.38-47, 2014.

FRANCO, E. A. P., BARROS, R. F. M., Uso e diversidade de plantas medicinais no Quilombo Olho D água dos Pires, Esperantina, Piauí. *Rev Bras Plant Med*, v.8, p.78-88, 2006.

FREIBERGER, C., VANDERJAGT, D., PASTUSZYN, A., GLEW, R., MILLSON, M. AND GLEW, R., Nutrient content of the edible leaves of seven wild plants from Niger. *Plant culture*, 1998.

FRESE, K. K., TUVESON, D. A., Maximizing mouse cancer models. *Nat Rev Cancer*. v.7, n.9, p.645-658, 2007.

GADELHA, C. S., PINTO JUNIOR, V. M., BEZERRA, K. K. S., PEREIRA, B. B. M., MARACAJÁ, P. B., Estudo bibliográfico sobre o uso das plantas medicinais e fitoterápicos no Brasil. *Revista Verde (Mossoró-RN)*, v. 8, n. 5, p. 208-212 (Edição Especial). 2013.

GHASEMZADEH, A., GHASEMZADEH, N., Flavonoids and fenolic acids: role and biochemical activity in plants and human. *Journal of medicinal Plants research*, v.5, n.31, p.6697-6703, 2011.

GIOVANNUCCI, E., Modifiable risk factors for colon cancer. *Gastroenterol Clin North Am.* v.31, n.4, p. 925-943, 2002.

GIULIETTI, A. M., RAYMOND, M. H., QUEIROZ, L. P., WANDERLEY, M. G. L., VAN DEN BERG, C., JAMES, D. B., ABU, E. A., WUROCHEKKE, A. U., ORGI, G. N., Phytochemical and antimicrobial investigation of the aqueous and methanolic extracts of *Ximenia Americana*. *Journal of medical science* , v.7, n.2, p284-288, 2007.

GUERRA, A. M. N. M., PESSOA, M. F., SOUZA, C. S. M., MARACAJÁ, P. B., Utilização de plantas medicinais pela comunidade rural Moacir Lucena, Apodi-RN. *Biosci. J.*, Uberlândia, v. 26, n. 3, p. 442-450, 2010.

GREENHOUGH, A., SMARTT, H. J. M., MOORE, A. E., ROBERTS, H. R., WILLIAMS, A. C., PARASKEVA, C., KAIDI, A., The COX-2/PGE2 pathway: key roles in the hallmarks of cancer and adaptation to the tumour microenvironment. *Carcinogenesis*, v.30, n.3, p. 377-86, 2009.

GRIFFITHS, A. J. F., MILLER, J. H., SUZUKI, T. D., LEWONTIN, R. C., GELBART, W. M., Mecanismos de Mutação Gênica. In: *Introdução à Genética*. 9º ed. Guanabara e Koogan RJ. 726p. 2008.

GRIVENNIKOV, S. I.; GRETEN, F. R.; KARIN, M., Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*, v.140, n. 6, p. 883-99, 2010.

GRIVENNIKOV, S. I.; KARIN, M., Inflammation and oncogenesis: a vicious connection. *Curr Opin Genet Dev*, v.20, n.1, p.65-71, 2010.

GUINNEY, J., DIENSTMANN, R., WANG, X., DE REYNIÈS, A., SCHLICKER, A. SONESON, C., The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nat Med.* v.21, n.11, p.1350-1356, 2015.

GUPTA, A. K., PRETLOW, T. P., SCHOEN, R. E., Aberrant crypt foci: what we know and what we need to know. *Clin Gastroenterol Hepatol*, v.5, n.5, p.526-533, 2007.

HALLIWELL, B., Dietary polyphenols: Good, bad, or indifferent for your health? *Cardiovascular Research*, v.73, p.341-347, 2007.

HANAHAH, D., WEINBERG, R. A., The hallmarks of cancer. *Cell*, v. 100, n. 1, p. 57-70, 2000.

HE, L., TIAN, D. A., LI, P. Y., HE, X. X., Mouse models of liver cancer: progress and recommendations. *Oncotarget.* v.6, n.27, p.23306-23322, 2015.

HEMAMALINI, K., SRIKANTH, A., SUNNY, G., PRANEETHKUMAR, H., Phytochemical screening and analgesic activity of methanolic extract of *Ximenia americana.*, *Current Pharma Research*, v.1, n.2, p.153-156, 2011.

IGNAT, I., VOLF, I., POPA., V, I., A critical review of methods for characterization of polyphenolic compounds in fruits of vegetables. *Food Chemistry* v.126, n.4, p.1821-1835, 2011.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA)., Estatísticas do Câncer: Vigilância do câncer e fatores de risco. 2014. Disponível em: <https://mortalidade.inca.gov.br/MortalidadeWeb/>. Acesso em Julho de 2018.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC)., 1,2-DIMETHYLHYDRAZINE(Group 2A),v.71, 1999, p.947.Disponível em: <http://www.inchem.org/documents/iarc/vol71/036-dimhydr.html>. Acesso em julho de 2018.

JACOB, S., PRAZ, F., DNA mismatch repair defects: role in colorectal carcinogenesis. *Biochimie*, v.84, n.1, p.27-47, 2002.

JAMES, D. B., ABU, E. A., WUROCHEKKE, A. U., ORGI, G. N. Phitochemical and Antimicrobial investigation of the aqueous and methanolic extracts of *Ximenia Americana*. *Journal of Medical Science*, Zaria, v.7, n. 2, pp. 284-288, 2007.

JENNER, A. M., RAFTER, J., HALLIWELL, B., Human fecal water content of phenolics: the extent of colonic exposure to aromatic compounds. *Free Radical Biology and Medicine*, v.38, p.763-772, 2005.

JONES, P. A., BAYLIN, S. B., The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet*, v.3, n.6, p.415-428, 2002.

JOVEN, J., MICOL, V., SEGURA-CARRETERO, A., VILLAVERDE. C. A., MENÉNDEZ, J. A., For the Bioactive Food Components Platform., Polyphenols and the Modulation of Gene Expression Pathways: Can We Eat Our Way Out of the Danger of Chronic Disease?., *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v.54, n.8, p.985-1001, 2014.

KABRAN, G. M. R., MAMYRBEKOYA-BEKRO, J. A., PIRAT, J. L., LECOUCVEY, M., SAINTE-CATHÉRINE, O., SOMMERER, N., BEKRO, Y. A., UPLC-MS. Quantification and anticancer potencial of and *Ximenia americana* hidroacetonico, crude extract leaves. *Der Chemica Sinica*, v.8, n.1, 2017.

KAMILOGLU, S., TOYDEMIR, G., BOYACIOGLU, D., BEEKWILDER, J., HALL, R. D., CAPANOGLU, E., A Review on the Effect of Drying on Antioxidant Potential of Fruits and Vegetables., *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v.56, p.110-129, 2016.

KAWAMORI, T., RAO, C. V., SEIBERT, K., REDDY B. S., Chemopreventive activity of celecoxib, a specific cyclooxygenase-2 inhibitor, against colon carcinogenesis. *Cancer Res*, v.58, n.3, p.409-412, 1998.

KHAN, Z., KHAN, N., TIWARI, P. R., NAND, K. S., GBKS, P., PRAKASH, S. B., Biology of Cox-2: an application in cancer therapeutics. *Curr Drug Targets*, v.12, n.7, p. 1082-1093, 2011.

KHAN, R., KHAN, A. Q., LATEEF, A., REHMAN, M. U., TAHIR, M., ALI, F., HAMIZA, O.O., SULTANA, S., Glycyrrhizic acid suppresses the development of precancerous lesions via regulating the hyperproliferation, inflammation, angiogenesis and apoptosis in the colon of Wistar rats. *PLoS One*, v.8, n.2, 2013.

KELLOFF, G. J., SIGMAN, C. C., GREENWALD, P., Cancer chemoprevention: progress and promise. *Eur J Cancer*, v.35, n.14, p.2031-2038, 1999.

KIRSCH-VOLDERS, M., VANHAUWAERT, A., EICHENLAUB-RITTER, U., DECORDER, I., Indirect mechanisms of genotoxicity. *Toxicol Lett*, v.140-141, p. 63- 74, 2003.

KOLNIAK-OSTEK, J., OSZMIANSKI, J., Characterization of phenolic compounds in different anatomical pear (*Pyrus communis* L.) parts by ultra-performance liquid chromatography photodiode detector-quadrupole/time of flight-mass spectrometry (UPLC-PDA-Q/TOF-MS), *International Journal of Mass Spectrometry*, v.392, p.154-163, 2015.

KONÉ, W. M., ATINDEHOU, K. K., TERREAUX, C., HOSTETTMANN, K., TRAORÈ, D., DOSSO, M., Tradicional medicine in North Cote-d'Ivoire: screening of 50 medicinal plants for antibacterial activity. *J. Ethnopharmacol.* v..93, p. 43-49, 2004.

KONATE, K., KONATE, O. N., ARSÈNE. M., SOUZA, A., OKSANA S., Anti-Nociceptive and Anti-Inflammatory Properties of Polyphenol-Rich Fractions of Roots from *Ximenia americana* L., (Olacaceae), in *Experimental Mice, Human Journals Research Article*, v.12, 2018.

KRISHNAIAH, D., SARBATLY, R., NITHYANANDAM, R., A review of the antioxidant potential of medicinal plant species, *Food Bioprod. Proc.* v.89, p.217-233 2011.

LAMIEN-MEDA, A., LAMIEN, C. E., COMPAORÉ, M. M. Y., MEDA, R. N. T., KIENDREBEOGO, M., ZEBE, B., MILLOGO, J.F., NACOULMA, O. G., Polyphenol Content and Antioxidant Activity of Fourteen Wild Edible Fruits from Burkina Faso. *Molecules*, v.13, n.3, p.581-594, 2008.

LANDETE, J. M., Updated Knowledge about Polyphenols: Functions, Bioavailability, Metabolism, and Health., *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v.52, n.10, p. 936-948, 2012.

LAPA, A. J., SOUCCAR, C., LIMA-LANDMAN, M. T. R., GODINHO, R. O., NOGUEIRA, T. C. M. L. *Farmacologia e toxicologia de produtos naturais*. IN SIMÕES., C. M. O., SCHENKEL, E. P., GOSMANN, G., MELLO, J. C. P., MENTZ, L. A., PETROVICK, P. R (org). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5.ed. Porto Alegre: Ed. Universidade/UFRGS, 2004.

LASA, M., MAHTANI, K. R., FINCH, A., BREWER, G., SAKLATVALA, J., CLARK, A. R., Regulation of cyclooxygenase 2 mRNA stability by the mitogen-activated protein kinase p38 signaling cascade. *Mol Cell Biol*, v.20, n.12, p. 4265-4274, 2000.

LEVINE, J. S, AHNEN, D. J., Adenomatous polyps of the colon. *N Engl J Med.* n.355, v.24, p. 2551-2557, 2006.



LINKOUS, A., YAZLOVITSKAYA, E., Cytosolic phospholipase A2 as a mediator of disease pathogenesis. *Cell Microbiol*, v.12, n.10, p. 1369-1377, 2010.

LORENZI, H., MATOS, F. J. A., *Plantas Medicinais No Brasil: Nativas e Exóticas*, 2 ed.; Instituto Plantarum: Nova Odessa, São Paulo, Brasil, p.399-400, 2008.

MACÊDO, D. G., RIBEIRO, D. A., COUTINHO, H. D. M., MENEZES, I. R. A., SOUZA, M. M. A., Práticas terapêuticas tradicionais: uso e conhecimento de plantas do cerrado no estado de Pernambuco (Nordeste do Brasil), *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*. v.14, n.6, p.491-508, 2015.

MADDISON, K., CLARKE, A. R., New approaches for modelling cancer mechanisms in the mouse. *J Pathol*. v.205, n.2., p.181-193, 2005.

MAGALHÃES, L. S., GUERRA, C., AZEVEDO, L.R., CRESPO, J. M. R. S., Avaliação da atividade antibacteriana do extrato de *Caesalpinia ferrea* Martius e desenvolvimento de uma formulação fitocosmética. *Revista científica da faminas*, v.11, n.1, 2015.

MAIA, G. N., *Caatinga: árvores e arbustos e suas utilidades*. 1nd. ed. D & Z Computação Gráfica: São Paulo. 2004.

MAIKAI, V. A., KOBO, P. I., MAIKAI, B. V., Antioxidant properties of *Ximenia americana*. *Afr J Biotechnol*, v.9, p.7744-7746, 2010.

MANTOVANI, A. et al. Cancer-related inflammation. *Nature*, v.454, n.7203, p.436-444, 2008.

MARON, D. M., AMES, B. N., Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutation Research*, v.113, p. 173-215, 1983.

MATOS, F. J. A., *Plantas medicinais: guia de seleção e emprego das plantas usadas em fitoterapia no Nordeste do Brasil*. Fortaleza. Imprensa Universitária, 2007.

MAZUE, F. et al. Differential protective effects of red wine polyphenol extracts (RWEs) on colon carcinogenesis. *Food Funct*, v. 5, n. 4, p. 663-670, 2014.

MATOS, F. J. A., *Plantas medicinais: guia de seleção e emprego das plantas usadas em fitoterapia no Nordeste do Brasil*. 3 ed. Fortaleza, imprensa Universitária, 2007.

MELO, J. G. et al. Medicinal plants used as antitumor agents in Brazil: an ethnobotanical approach. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, v. 2011, p. 365-359, 2011.

MEVY, J. P., BESSIERE, J. M., GREFF, S., ZOMBRE, G., VIANO, J., Composition of the volatile oil from the leaves of *Ximenia americana* L. *Biochem Syst Ecol*, v.34, p.549-553, 2006.

MORAIS-COSTA, F.; SOARES, A.C.M.; BASTOS, G.A.; NUNES, Y.R.F.; GERASEEV, L.C.; BRAGA, F.C.; LIMA, W.D.; DUARTE, E.R. Plants of the Cerrado naturally selected

by grazing sheep may have potential for inhibiting development of *Haemonchus contortus* larva. *Trop. Anim. Health Prod.*, v.47, 1321-1328, 2015.

MORAIS, S. M., DANTAS, J. D. P., SILVA, A. R. A., MAGALHÃES, E., Plantas medicinais usadas pelos índios Tapebas do Ceará. *Revista Brasileira de Farmacognosia.*, João Pessoa, v. 15., n. 2, p.167-177, 2005.

MOSER, A. R., PITOT, H. C., DOVE, W. F., A dominant mutation that predisposes to multiple intestinal neoplasia in the mouse. *Science.* v.247, p.322-324, 1990.

MOURA, N. A., Efeitos da ingestão de simbiótico e indol-3-carbinol sobre o processo de carcinogênese química de cólon em ratos Wistar alimentados com dieta contendo heme (2015). Tese apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, 89p.

MURDOCH, C. et al. The role of myeloid cells in the promotion of tumour angiogenesis. *Nat Rev Cancer*, v.8, n.8, p. 618-631, 2008.

MYERS, N., MILTTERMEIER R. A., MILTTERMEIER C. G., FONSECA G. A. B., KENTS, J., Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, v.403, p.853-858, 2000.

NAVARRO-MOLL, M. C., Uso racional de las plantas medicinales. *Pharmaceutical Care*, Barcelona, v.2, p.9-19, 2000.

NEWELL, L. E., HEDDLE, J. A., The potent colon carcinogen, 1,2- dimethylhydrazine induces mutations primarily in the colon. *Mut Res*, v.564, n.1, p.1-7, 2004.

OGUNLEYE, D. S., IBITOYE, S. F., Studies of antimicrobial activity and chemical constituents of *Ximenia americana*. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, v.2, n.2, p. 239-241, 2003.

OLABISSI, O. A., MOUSSA, O., MOUSTAPHA, O., EDGARD, Z. F., ELÉONORE, K., MARIUS, L., PIERRE, G.I., Acute toxicity and anti-inflammatory activity of aqueous ethanol extract of root bark of *Ximenia americana* L. (Olacaceae). *African J. Pharm. Pharmacol* v.5, p.806-811, 2011.

OLIVEIRA, F. C. S., BARROS, R. F. M., MOITA NETO, J. M., Plantas medicinais utilizadas em comunidades rurais de Oeiras, semiárido piauiense. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v.12, n.3, p.282-301, 2010.

OMER, M. E. F. A., ELNIMA, E. I. Antimicrobial activity of *Ximenia americana*. *Fitoterapia*, v. 74, p. 122-126, 2003.

OSHIMA, M. et al. Suppression of intestinal polyposis in Apc delta716 knockout mice by inhibition of cyclooxygenase 2 (COX-2). *Cell*, v.87, n.5, p.803-809, 1996.

OSMAK, M., KOVACEK, I., LJUBENKOV, I., SPAVENTI, R., ECKERT-MAKSIĆ, M., Ascorbic acid and 6-deoxy-6-chloro-ascorbic acid: potential anticancer drugs. *Neoplasma*. v.44, n.2, p.101-107, 1997.

OSÓRIO, C. HURTADO, N. DAWID, N.HOFMANN, T. HEREDIA-MIRA, F. J., MORALES, A. L., Chemical characterisation of anthocyanins in tamarillo (*Solanum betaceum* Cav.) and Andes berry (*Rubus glaucus* Benth.) fruits, *Food chemistry*, v.132, n.4, p.1915-1921, 2012.

PAGOTTO, T. C. S. et al. Bioma cerrado e área estudada. In: PAGOTTO, T. C. S.; SOUZA, P. R. Biodiversidade do complexo Aporé-Sucuriú : subsídios à conservação e ao manejo do cerrado: área prioritária 316 – Jauru . Campo Grande: UFMS, p.18-30, 2006.

PANTOJA, P. S., ASSREUYB, A. M. S., SILVA, R. O., DAMASCENO, S. R. B., MENDONÇA, V. A., MENDES, T. S., MORAIS, J. A. V., ALMEIDA, S. L., TEIXEIRA, A. E. E. A., SOUZA, M. H. L. P., PEREIRA, M. G., SOARES, P. M. G., The polysaccharide-rich tea of *Ximenia americana* barks prevents indomethacin-induced gastrointestinal damage via neutrophil inhibition, *Journal of Ethnopharmacology*, p.195-201, 2018.

PANDURANGAN, A. K. et al. Luteolin, a bioflavonoid inhibits azoxymethane-induced colon carcinogenesis: Involvement of iNOS and COX-2. *Pharmacogn Mag*, v.10, n.2, p. 306- 310, 2014.

PEREIRA, M., Avaliação dos efeitos quimiopreventivos da vitamina c e do ácido acetilsalicílico em modelo animal de câncer colorretal (2016). Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense, 107p.

PEREIRA, R. J., CARDOSO, M. G., Vegetable secondary metabolites and antioxidants benefits *J. Biotec. Biodivers.* v. 3, n.4, p. 146-152. 2012.

PERSE, M., CERAR, A., Morphological and molecular alterations in 1,2 dimethylhydrazine and azoxymethane induced colon carcinogenesis in rats. *J. Biomed Biotechnol.*, 2011.

PERVAIZ, A., ADWAN, H., BERGER, M. R., Riproximin: A type II ribosome inactivating protein with antineoplastic potential induces IL24/MDA7 and GADD genes in colorectal cancer cell lines. *Int. J. Oncol.* v. 47, 981-990, 2015.

PIERRE, F., PEIRO, G., TACH, E. S., CROSS, A. J., BINGHAM, S. A., et al.: New marker of colon cancer risk associated with heme intake: 1,4-dihydroxynonane mercapturic acid. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2006;

POLLOCK, R. E. *Manual de Oncologia Clínica*. São Paulo: Fundação Oncocentro de São Paulo, 1316, 2006.

POLYAK, K., HAMILTON, S. R., VOGELSTEIN, B., KINSLER, K. E., Early alteration of cell-cycle-regulated gene expression in colo-rectal neoplasia. *Am. J. Pathol.*, v.149, p. 381-387, 1996.

PRIOLLI, D. G., CANELLOI, T. P., LOPES, C. O., VALDÍVIA, J. C., MARTINEZ, N. P., AÇARI, D. P., CARDINALI, I. A., RIBEIRO, M. L., Oxidative DNA damage and  $\beta$ -catenin expression in colorectal cancer evolution. *Int J Colorectal Dis.* v.28, n.5, p.713-722, 2013.

QIAN, B. Z., POLLARD, J. W., Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell*, v.141, n.1, p.39-51, 2010.

QUINTANS JUNIOR, L. J., ALMEIDA, R. N., FALCO, A. C. G. M., AGRA, M. F., SOUSA, M. F. V., BARBOSA FILHO, J. M., Avaliação da Atividade Anticonvulsivante de Plantas do Nordeste Brasileiro. *Acta Farm. Bonaerense.* v.21, p. 179-184, 2002.

RABELLO-GAY, M. N., RODRIGUES, M. A. L. R., MONTELEONE-NETO, R., Mutagênese, Teratogênese e Carcinogênese-Métodos e Critérios de Avaliação. Ed. Sociedade Brasileira de Genética, Revista Brasileira de Genética. Ribeirão Preto. 1991. 246p.

RAJU, J., Azoxymethane-induced rat aberrant crypt foci: relevance in studying chemoprevention of colon cancer. *World J Gastroenterol.*, v.43, p.6632-6635, 2008.

RATES, S. M. K., Promoção do uso racional de fitoterápicos: Uma abordagem no ensino de Farmacognosia., *Revista Brasileira de farmacognosia*, v.11 n.2, p.57-69, 2001.

REICHLING, T., GOSS, K. H., CARSON, D. J., HOLDCRAFT, R.W., LEY-EBERT, C., WITTE, D., ARONOW, B. J., GRODEN, J., Transcriptional profiles of intestinal tumors in *Apc* (*Min*) mice are unique from those of embryonic intestine and identify novel gene targets dysregulated in human colorectal tumors. *Cancer Res.* v.65, p.166-176, 2005.

REYES-GARCÍA, V., The relevance of traditional knowledge systems for ethnopharmacological research: theoretical and methodological contributions. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, v.6, p.32, 2010.

RESENDE, F. A., Estudo do potencial antimutagênico, mutagênico, estrogênico e antibacteriano de flavonoides (2011). Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP., 183p.

REZENKA, T., SINGLER, K., Identification of very long chain unsaturated fatty acids from *Ximenia* oil by atmospheric pressure chemical ionization liquid chromatography –mass spectroscopy. *Phytochemistry*, v.68, p. 925-934, 2007.

RIBEIRO, L. R., MARQUES, E. K., A importância da mutagênese ambiental na carcinogênese humana. In: Ribeiro, L. R, Salvadori, D. M. F., Marques, E. K., *Mutagênese Ambiental*. Editora ULBRA. 2003. p. 21-27.

RIBEIRO, M. L., PRIOLLI, D. G., MIRANDA, D. D., ARÇARI, D. P., PEDRAZZOLI, J. J. R., MARTINEZ, C. A., Analysis of oxidative DNA damage in patients with colorectal cancer. *Clin Colorectal Cancer.* v.7, n.4, p.267-272, 2008.

RISIO, M., The natural history of adenomas. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* v.24, n.3, p. 271-280, 2010.

RODRIGUES, M. A. M., SILVA, L. A. G., SALVADORI, D. M. F., CAMARGO, J. L. V., MONTENEGRO, M. R., Aberrant crypt foci and colon cancer: comparison between a short- and medium term bioassay for colon medium-term bioassay for colon carcinogenesis using dimethylhydrazine in Wistar rats. *Braz J. Med. Biol. Res.*, v.35, p.351-355, 2002.

RODRIGUEZ-RAMIRO, I. et al. Cocoa polyphenols prevent inflammation in the colon of azoxymethane-treated rats and in TNF-alpha-stimulated Caco-2 cells. *Br J Nutr.*, v. 110, n. 2, p. 206-215, 2013

ROQUE, A. A., ROCHA, R. M., LOIOLA, M. I. B., Uso e diversidade de plantas medicinais da Caatinga na comunidade rural de Laginhas, município de Caicó, Rio Grande do Norte (nordeste do Brasil), *Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu*, v.12, n.1, p.31-42, 2010.

RONCUCCI, L., MARIANI, F., Prevention of colorectal cancer: How many tools do we have in our basket? *Eur J Intern Med.* v.26, n.10, p.752-756, 2015.

RUSTGI, A. K. The genetics of hereditary colon cancer. *Genes Dev.*, v. 21, n. 20, p. 2525-2538, 2007.

SACANDE, M., VAUTIER, H., *Ximenia americana* L. Seed Leaflet. v.112, p.1-2, 2006.

SALES, K. J.; GRANT, V.; JABBOUR, H. N. Prostaglandin E2 and F2alpha activate the FP receptor and up-regulate cyclooxygenase-2 expression via the cyclic AMP response element. *Mol Cell Endocrinol.*, v. 285, n.1-2, p. 51-61, 2008.

SAMPAIO, P. B., AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA DE COMPOSTOS FENÓLICOS IN VITRO E BIOLÓGICA DO EXTRATO PURIFICADO DE AÇAÍ (*Euterpe oleracea*) EM MODELO IN VIVO DE CARCINOGENESE DE CÓLON INDUZIDA (2014)., Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas., Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos, 127p.

SANTANA, C. P., MEDEIROS, F. D., CORREIA, L. P. DINIZ, P.H. G. D., VEÂRAS, G., MEDEIROS, A. C. D., Dissolution and uniformity of content of tablets developed with extract of *Ximenia americana* L., *PLoS ONE*, v.13, n.5, 2018.

SANTOS, S. L. D. X., Animais e plantas utilizados como medicinais por uma comunidade rural do semi-árido da Paraíba, Nordeste do Brasil (2009). Dissertação de mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, Brasil.

SARMENTO, J. D. A., MORAIS, P. L. D., SOUZA, F. I., MIRANDA, M. R. A., Physical-chemical characteristics and antioxidant potential of seed and pulp of *Ximenia americana* L. from the semiarid region of Brazil, *African Journal of Biotechnology.* v. 14, n.20, p.1743-1752, 2015.

SIDDAIAH, M., JAYAVEERA, K., MALLIKARJUNA, R., RAVINDRA, R., YASODHA, K., Phytochemical screening and analgesic activity of methanolic extract of *Ximenia Americana*. *J.Pharm.Chem.*, v.3, p.23-25, 2009.

SINICROPE, F. A.; GILL, S. Role of cyclooxygenase-2 in colorectal cancer. *Cancer Metastasis Rev.*, v. 23, n. 1-2, p. 63-75, Jan-Jun 2004.

SMYTH, M. J., DUNN, G. P., SCHREIBER, R. D., Cancer immunosurveillance and immunoediting: the roles of immunity in suppressing tumor development and shaping tumor immunogenicity. *Adv Immunol*, v.90, p.1-50, 2006.

SILVA, C. S. P., PROENÇA, C. E. B., Uso e disponibilidade de recursos medicinais no município de Ouro Verde de Goiás, GO, Brasil. *Acta Bot Bras*, v. 22, p. 481-492, 2008.

SORO, T. Y., TRAORE, F., SAKANDE, J., Activité analgésique de l'extrait aqueux de *Ximenia americana* (Linné) (Olacaceae). *C. R. Biol.* v.332, 371-377,2009.

SATOTO, G. F., Estudo do óleo de *Ximenia americana* L. de produção artesanal angolana: avaliação das propriedades químicas e biológicas (2017). Dissertação apresentada Universidade de Lisboa faculdade de ciências departamento de química e bioquímica.

SULEMAN, S., TUFAA, T. B., KEBEBEA, D., BELEWA, SILESHI., MEKONNENA, Y., GASHEB, F, MUSSAB, S., WYNENDAELEC, E., DUCHATEAUE, L., SPIEGELEER, B., Treatment of malaria and related symptoms using traditional herbal medicine in Ethiopia, *Journal of Ethnopharmacology*, v.213, p. 262-279, 2018.

SURH, Y. J., Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nat Rev Cancer*, v. 3, n.10, p.768-780, 2003.

SCHENKEL, E. P., GOSMANN, G, PETROVICK, P. R. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. In Simões CMO. (Org.) *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Porto Alegre/Florianópolis: Editora UFRGS/Editora da UFSC, Brasil, 2003.

SCHMUTTE, C., YANG, A. S., NGUYEN, T. T., BEART, R. W., JONES, P. A., Mechanisms of the involvement of DNA methylation in colon carcinogenesis. *Cancer Res.* v.56, n.10, p.2375- 2381, 1996.

SHETTAR, A. K., KOTRESHA, K., KALI WAL, B. B., VEDAMURTHY, A. B., Evaluation of in vitro antioxidant and anti-inflammatory activities of *Ximenia americana* extracts. *Asian Pac. J. Trop. Dis.* v.5, p.918-923, 2015.

SHETAR, A. K., SATEESH, M.K., KALI WAL, B.B., VEDAMURTHY SHPITZ, A.B., BOMSTEIN, B., MEKORI, Y., COHEN, Y., KAUFMAN, R., GRANKIN, Z., BERNHEIM, M., In vitro antidiabetic activities and GC-MS phytochemical analysis of *Ximenia americana* extracts J. Proliferating cell nuclear antigen as a marker of cell kinetics in aberrant crypt foci hyperplastic polyps, adenomas, and adenocarcinomas of the human colon. *Am. J. Surg*, v.174, p.425-430, 2017.

SIDDAIAH, M., JAYAVEERA, K., MALLIKARJUNA, R., RAVINDRA, R., YASODHA K., Phytochemical screening and analgesic activity of methanolic extract of *Ximenia Americana*. *J.Pharm.Chem*, v.3, p.23-25, 2009.

SILVA, B. A. F., COSTA, R. H. S., FERNANDES, C. N. L., LEITE, H. I., RIBEIRO-FILHO, J., GARCIA, T. R., COUTINHO, H. D. M., WANDERLEY, A. G., MENEZES, I. R.

A., HPLC profile and antiedematogenic activity of *Ximenia americana* L.(Olacaceae) in mice models of skin inflammation, *Food and Chemical Toxicology*, v.119, p.199-205, 2018.

SILVA-LEITE, K. E. S., GIRÃO, D. K. F. B., PIRES, A. F., ASSREUY, A. M. S., MORAES, P. ALMIR F., CUNHA, A. P. RICARDO, N, M. P. S., CRIDDLE, D. N., SOUZA, M. H. L. P., PEREIRA, M. G. SOARES, P. M. G., *Ximenia americana* heteropolysaccharides ameliorate inflammation and visceral hypernociception in murine caerulein-induced acute pancreatitis: Involvement of CB2 receptors, *Biomedicine & Pharmacotherapy*. v.106, p.1317-1324, 2018.

SOUZA NETO JÚNIOR, J. C. S., Avaliação de feridas cutâneas em ratos tratadas com creme à base de extrato de Ameixa-do-Mato (*X. americana*) a 10%. (2016). Tese apresentada ao programa de Pós-graduação em biociência animal. Universidade Federal Rural do Pernambuco, 173p.

STRYKER, S. J., WOLFF, B. G., CULP, C. E., LIBBE, S. D, ILSTRUP, D. M., MACCARTY, R. L. Natural history of untreated colonic polyps. *Gastroenterology*. n.93, v.5, p. 1009-1013, 1987.

TERZIC, J. et al. Inflammation and colon cancer. *Gastroenterology*, v. 138, n. 6, p.2101-2114, 2010.

TETE, S. et al. Nutrition and cancer prevention. *Int J Immunopathol Pharmacol*, v. 25, n. 3, p. 573-581, 2012.

TONG, Y., YANG, W., KOEFFLER, H. P. Mouse Models of cancer colorectal. *Chin J Cancer*.; v.30, n.7, 450-462, 2011.

TORRE, L. A., BRAY, F., SIEGEL, R. L., FERLAY, J., LORTET-TIEULENT, J., JEMAL, A., Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer, J Clin*. v.65, n.2, p. 87-108, 2015.

TRAESEL, G. K., DE SOUZA, J. C., DE BARROS, A. L., SOUZA, M. A., SCHMITZ, W. O., MUZZI, R. M., OESTERREICH, S. A., ARENA, A. C., Acute and subacute (28 days) oral toxicity assessment of the oil extracted from *Acrocomia aculeata* pulp in rats. *Food Chem. Toxicol*. n.74, p.320-325, 2014.

TRAVERSO G, SHUBER A, OLSSON L, LEVIN B, JOHNSON C, HAMILTON SR, BOYNTON K, KINZLER KW, VOGELSTEIN B. Detection of proximal colorectal cancers through analysis of faecal DNA. *Lancet*. v.359, n.9304, p.403- 404, 2002.

TRAORÉ, M. S., BALDE, M. A., CAMARA, A., BALDE, E. S., DIANE, S. DIALLO, M. S. T., KEITA, A., COS, P., MAES, L., PIETERS, L., The malaria co-infection challenge: An investigation into the antimicrobial activity of selected Guinean medicinal plants. *J. Ethnopharmacol*. v.174, 576–581, 2015.

TUDEK, B., BIRD, R.P., BRUCE, E. W. R., Foci of aberrant crypts in the colons of mice and rats exposed to carcinogens associated with foods. *Cancer Res*., v.49, p.1236-1240, 1989.

VARMUS, H., The new era in cancer research. *Science*. v.312, n.5777, p.1162-1165, 2006.

- VENÂNCIO, A.M. Toxicidade aguda e atividade antinociceptiva do óleo essencial do *Ocimum basilicum* L. (manjeriçã), em *Mus musculus* (camundongos). (2006). Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão. 108p.
- VENDRAMINI-COSTA, D. B., CARVALHO, J. E., Molecular link mechanisms between inflammation and cancer. *Curr Pharm Des*, v. 18, n. 26, p. 3831-52, 2012.
- VERMA, A. K., BOUTWELL, R. K., Effects of dose and duration of treatment with the tumorpromoting agent, 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate on mouse skin carcinogenesis. *Carcinogenesis*, v. 1, n. 3, p. 271-276, 1980.
- VICENTINI, V. E. P., CAMPAROTO, M. L., TEIXEIRA, R. O., MANTOVANI, M. S., *Averrhoa carambola* L., *Syzygium cumini* (L.) Skeels and *Cissus sicyoides* L.: medicinal herbal tea effects on vegetal and test systems. *Acta Scientiarum*, n. 23, p. 593-598, 2001.
- VIEIRA, M. G. F., Aspectos morfológicos e morfométricos de feridas cutâneas em ratos Tratadas com extrato hidroalcoólico de ameixa-do-mato (*Ximenia americana*) a 10% (2018) Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em biociência animal, Universidade Rural do Pernambuco, 59p.
- VOSS, C., EYOL, E., BERGER, M. R., Identification of potent anticancer activity in *Ximenia americana* aqueous extracts used by African traditional medicine. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 211, p. 177-178, 2006.
- WANG., P., WANG, B., CHUNG,S., WU,Y., HENNING,S. M., VADGAMA J.V.,Increased chemopreventive effect by combining arctigenin, green tea polyphenol and curcumin in prostate and breast cancer cells., *RSC Advances*., v. 66., 2014.
- WARREN, C. A. et al. Quercetin may suppress rat aberrant crypt foci formation by suppressing inflammatory mediators that influence proliferation and apoptosis. *J Nutr*, v. 139, n.1, p.101-105, 2009.
- WEINBERG, R. A. *The Biology of Cancer*. Nova York e Londres: Garland Scienc, 2014.
- WEISS, D. J., WARDROP, K. J., (Eds). *Schalm's Veterinary Hematology*. 6th ed. Ames: Wiley Blackwell, 2010.
- WEITZMAN, S. A., GORDON, L. I. Inflammation and cancer: role of phagocyte-generated oxidants in carcinogenesis. *Blood*, v.76, n.4, p. 655-663, 1990.
- WHEELER, J. M., KIM, H. C., ILYAS, M., MORTENSEN, N. J., BODMER, W.F., Hypermethylation of the promotor region of the E-Cadherin gene (CDH1) in sporadic and ulcerative colitis associated colorectal cancer. v.48, n.3, p.367-371, 2003.
- WHEELER, J. M. D., Epigenetics, mismatch repair and colorectal cancer. *Ann R Coll Surg Engl*, v.87, n.1, 15-20, 2005.
- WU. X., HAWK, S. P. E., Chemoprevention – History and general principles., *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*.,v.25, n.4, p. 445-459, 2011.



XIAO, H., HAO, X., SIMI, B., JU, J., JIANG, H., REDDY, B.S., YANG, C. S. Green tea polyphenols inhibit colorectal aberrant crypt foci (ACF) formation and prevent oncogenic changes in dysplastic ACF in azoxymethane-treated F344 rats. *Carcinogenesis* v. 29, n. 1, p. 113-119, 2008.

YANG, K., FARD, S., FURRER, R., ARCHER, M. C., BRUCE, R., LIP, H. Y., MEHTA, R, O'BRIEN, P. J., GIACCA, A., WARD, W. E., FEMIA, P., CADERNI, G., MELINE, A., BANKS, K., Risk Factors for colorectal cancer in man induce aberrant crypt foci in rats: Preliminary Findings. *Nutrition and Cancer*. v.68,n.1, p.94-104, 2016.

YUSPA, S. H., POIRIER, M. C., Chemical carcinogenesis: from animal models to molecular models in one decade. *Adv Cancer Res*, v.50, p.25-70, 1988.