



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

EVERTON PANTOJA VALE

Estudo do extrato hidroetanólico de *Punica granatum* Linnaeus e do ácido elágico sobre os parâmetros citogenéticos e toxicológicos em camundongos Swiss

Macapá
2019

EVERTON PANTOJA VALE

Estudo do extrato hidroetanólico de *Punica granatum* Linnaeus e do ácido elágico sobre os parâmetros citogenéticos e toxicológicos em camundongos Swiss

Dissertação apresentada ao Programa de Pós –
Graduação em Ciências Farmacêuticas da
Universidade Federal do Amapá para obtenção do
Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Moacir de Azevedo Bentes
Monteiro Neto

Co-orientador: Prof. Dr. Francisco Fábio Oliveira de
Sousa

**Macapá
2019**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Biblioteca Central da Universidade Federal do Amapá
Elaborado por Orinete Costa Souza – CRB-11/920

Vale, Everton Pantoja.

Estudo do extrato hidroetanólico de *punica granatum* linnaeus e do ácido elágico sobre os parâmetros citogenéticos e toxicológicos em camundongos Swiss / Everton Pantoja Vale ; orientador, Moacir de Azevedo Bentes Monteiro Neto ; co-orientador, Francisco Fábio Oliveira de Sousa. – Macapá, 2019.

135 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Fundação Universidade Federal do Amapá, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Antigenotoxicidade. 2. Ácido elágico. 3. Teste de toxicidade. 4. Micronúcleo. 5. Pomegranate. 6. Romã. I. Monteiro Neto, Moacir de Azevedo Bentes, orientador. II. Sousa, Francisco Fábio Oliveira de, co-orientador. III. Fundação Universidade Federal do Amapá. IV. Título.

615.321 V149e
CDD. 22 ed.

**Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
da Universidade Federal do Amapá**

BANCA EXAMINADORA

Aluno(a): Everton Pantoja Vale

Orientador(a): Prof. Dr. Moacir de Azevedo Bentes Monteiro Neto

Co-Orientador(a): Prof. Dr. Francisco Fábio Oliveira de Sousa



Prof. Dr. Moacir de Azevedo Bentes Monteiro Neto
Presidente

Professor Doutor do Curso de Medicina da Universidade Federal do Amapá, UNIFAP.



Prof. Dr. Irlon Maciel Ferreira
Membro Titular

Professor Doutor do Curso de Licenciatura em Química da Universidade Federal do Amapá, UNIFAP.



Profª. Drª. Sílvia Maria Mathes Faustino
Membro Titular

Professora Doutora do Curso de Farmácia da Universidade Federal do Amapá, UNIFAP.

Data: 24 / 04 / 2019

***Dedico esta dissertação a minha família,
principalmente ao amor da minha
vida, Viridiane Souza Vale***

É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres de espírito, que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta, onde não conhecem nem vitória, nem derrota.”

(Theodore Roosevelt)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por estar sempre ao meu lado, guiando e iluminando meus caminhos, além de dá forças todos os dias e nunca larga as minhas mãos;

Aos meus amados pais, Rosineide Borges Pantoja e Orivaldo dos Santos Vale, por todo carinho, amor, cuidado e apoio na minha vida pessoal e profissional, por me ensinar a ser uma pessoa melhor, além de estar comigo em todos os momentos da minha vida, amo vocês de todo o meu coração;

As minhas irmãs Erica Noeli Pantoja Vale, Hellem Pantoja do Vale e ao meu irmão Ekison Pantoja Vale, por todo o apoio aos meus estudos, pela confiança, paciência e reconhecer e superar as dificuldades junto a mim, meus chatos que amo tanto;

Ao amor da minha vida, Viridiane Souza Vale, por estar comigo em todos os momentos, por ter me apoiado e incentivado a ser uma pessoa melhor a cada dia, por ter me dado carinho nessa jornada, além de ter me mostrado que tudo é possível para aquele que crê, pra sempre teu S2, te amo;

A minha outra família que Deus me presenteou, Valdenice, Ruth, Ivanilson e Valdeilson, por ter me aturado nesses últimos anos e estarem me dando todo o carinho e apoio nesta jornada;

Ao meu orientador Prof. Dr. Moacir de Azevedo Bentes Monteiro Neto, pela paciência, apoio, pelos ótimos conselhos durante o desenvolvimento desta pesquisa e por me incentivar a correr atrás dos meus sonhos, me mostrando que posso conseguir tudo aquilo que almejo com foco e determinação, além de sua amizade;

Ao meu Co-orientador Prof. Dr. Francisco Fábio Oliveira de Sousa e ao Laboratório de Controle de Qualidade, Bromatologia e Microbiologia da Universidade Federal do Amapá – UNIFAP, por ter me ajudado com recursos materiais para o desenvolvimento deste trabalho, pela disponibilidade e ensinamento, me mostraram o melhor caminho a trilhar durante esses anos e pela confiança que demonstrou ter em nossa pesquisa e por sua amizade;

Aos meus amigos Edmilson dos Santos Moraes e Ana Paula Santos Rodrigues, pela amizade que se iniciou desde a graduação e por todo apoio durante esses anos e pelo carinho e amor que levaremos pra vida toda;

Aos meus amigos Lucas Rodrigues do Rego e Danilo Dheyvison Nascimento Pureza que adquirir durante essa caminhada, pela ajuda, conselho, parceria, trabalho em equipe e por terem feito essa pesquisa se tornar concreto e realizado com ótimos resultados e ao Grupo de Pesquisas Citogenéticas e Biomoleculares (GPCBIO);

A todos os colegas da turma de mestrado PPGCF / 2017.1, pelas experiências e apoios compartilhados e pelas palavras que de alguma forma contribuíram para a realização desta pesquisa.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas – PPGCF pelo conhecimento transmitidos durante todo o curso;

Ao secretário administrativo do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas – PPGCF, Edson Júnior, pelas informações e dicas, além de tudo por ter sido um amigo;

A Universidade Federal do Amapá - UNIFAP, pela oportunidade de cursar um curso de pós-graduação na linha de pesquisa pretendida. Importante para quem sonha em seguir carreira em Docência e Pesquisa;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES / Fundação de Amparo à Pesquisa no Amapá – FAPEAP pelo apoio financeiro concedido através da atribuição de uma bolsa de Mestrado. Pois foi através desta, que foi possível o financiamento e a realização desta pesquisa;

A todos aqueles que contribuíram de alguma forma e não foram mencionados aqui, obrigado pelo apoio e carinho.

	LISTA DE TABELAS.....	XII
	LISTA DE FIGURAS.....	XIV
	LISTA DE ANEXOS.....	XVII
	SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS.....	XVIII
	RESUMO.....	XX
	ABSTRACT.....	XXI
1	INTRODUÇÃO.....	22
1.1.	<i>Punica granatum</i> Linnaeus.....	23
1.1.1	Composição centesimal na romã.....	27
1.1.2	Metabólitos secundários na romã.....	28
1.2	ÁCIDO ELÁGICO.....	30
1.3	MODELO DE ANÁLISE CITOGENOTÓXICO E GENÉTICA TOXICOLÓGICA.....	32
1.3.1	Teste de micronúcleo.....	36
1.3.2	Doxorrubicina.....	37
2	OBJETIVOS	40
2.1.	OBJETIVO GERAL	40
2.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	40
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	41
3.1	OBTENÇÃO DO EXTRATO DE <i>Punica granatum</i> Linnaeus E DO ÁCIDO ELÁGICO.....	41
3.1.1	Preparação do extrato da casca de romã	41
3.2	AGENTE QUÍMICO INDUTOR DE DANOS NO DNA.....	42
3.4	OBTENÇÃO E MANUTENÇÃO DOS ANIMAIS.....	42
3.5	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	43
3.6	PARÂMETROS AVALIADOS.....	45

3.6.1	Massa corpórea.....	45
3.6.2	Teste do micronúcleo.....	45
3.6.2.1	Análise das lâminas.	47
3.6.3	Parâmetros hematológicos.....	48
3.6.4	Análise macroscópica, peso relativo e microscópico dos órgãos.....	48
3.6.4.1	Análise macroscópica e peso relativo dos órgãos.	48
3.6.4.2	Análise microscópica dos órgãos.....	49
3.6.4.2.1	<i>Fígado</i>	49
3.6.4.2.2	<i>Baço</i>	50
3.6.4.2.3	<i>Coração</i>	50
3.6.4.2.4	<i>Rins</i>	50
3.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	51
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	52
4.1.	<i>Punica granatum</i> Linnaeus.	52
4.1.1	Massa corpórea dos animais.....	52
4.1.2	Teste de micronúcleo.	53
4.1.2.1	Genotoxicidade e antigenotoxicidade de <i>Punica granatum</i> Linnaeus.....	53
4.1.2.2	Índice de divisão nuclear – citotoxicidade de <i>Punica granatum</i> Linnaeus.	56
4.1.3	Parâmetros hematológicos.....	58
4.1.4	Análise macroscópica, microscópica e peso relativo dos órgãos.....	59
4.2	ÁCIDO ELÁGICO.....	63
4.2.1	Massa corpórea dos animais.....	63
4.2.2	Teste de micronúcleo.	64
4.2.2.1	Genotoxicidade e antigenotoxicidade do ácido elágico.	64
4.2.2.2	Índice de divisão nuclear – citotoxicidade do ácido elágico.	67
4.2.3	Parâmetros hematológicos.....	69
4.2.4	Análise macroscópica, microscópica e peso relativo dos órgãos.....	70
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	74

REFERÊNCIAS	75
Anexo 01 – Relação Nacional de plantas medicinais de interesse ao SUS – RENISUS.	88
Anexo 02 – Parecer do Comitê de Ética.....	90
Anexo 03 – Comprovante de submissão na <i>Journal of Ethnopharmacology</i> do Manuscrito: Cytogenetic and toxicological effects of <i>Punica granatum</i> Linnaeus fruit peel hidroethanolic extract in mice.....	91
Anexo 04 – Manuscrito: Protective effect of ellagic acid against doxorubicin-induced genotoxicity in polychromatic erythrocytes	108
Anexo 05 – Manuscrito: Potencial genotóxico e alterações histopatológicas em camundongos Swiss tratados com Doxorubicina: toxicidade aguda	124

Tabela 01 –	Composição da <i>Punica granatum</i> Linnaeus (Romã) <i>in natura</i> por 100 gramas de parte comestível: Centesimal, minerais, vitaminas e colesterol.....	27
Tabela 02 –	Valores de massa/carga (m/z) obtidos em ensaio de HPLC-HRMS (ESI) para a amostra de <i>Punica granatum</i> L. (Identificação confirmada usando padrões comerciais)	30
Tabela 03 –	Grupos experimentais e protocolos de tratamentos para teste do micronúcleo utilizando o extrato hidroetanólico da casca do fruto de <i>Punica granatum</i> Linnaeus (21 dias de tratamento).....	44
Tabela 04 –	Grupos experimentais e protocolos de tratamentos para teste do micronúcleo utilizando ácido elágico (21 dias de tratamento).	44
Tabela 05 –	Média e desvio padrão das frequências de eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCMNs) em sangue periférico de camundongos Swiss (24 horas, 48 horas, 7 dias, 14 dias e 21 dias) de animais tratados com diferentes concentrações do extrato hidroetanólico de <i>Punica granatum</i> Linnaeus e seus respectivos controles.....	54
Tabela 06 –	Índice de divisão nuclear (IDN) em sangue periférico de animais submetidos a diferentes concentrações do extrato hidroetanólico da casca do fruto de <i>Punica granatum</i> Linnaeus e/ou DXR e seus respectivos controles, (24 horas, 48 horas, 7 dias, 14 dias e 21 dias) após tratamentos.	57
Tabela 07 –	Efeito do Extrato hidroetanólico da casca da fruta <i>Punica granatum</i> Linnaeus sobre os parâmetros eritrocitários e leucograma de camundongos Swiss.	58
Tabela 08 –	Efeito do extrato hidroetanólico da casca da fruta de <i>Punica granatum</i> Linnaeus sobre a massa média dos órgãos dos animais tratados durante 21 dias com diferentes concentrações.	59

Tabela 09 –	Frequências de eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCMNs) com suas respectivas médias e desvio padrão em sangue periférico de camundongos Swiss (24 horas, 48 horas, 7 dias, 14 dias e 21 dias) de animais tratados com diferentes concentrações do ácido elágico e seus respectivos controles.....	65
Tabela 10 –	Índice de divisão nuclear (IDN) em sangue periférico de animais submetidos a diferentes concentrações de AE e/ou DXR e seus respectivos controles (24 horas, 48 horas, 7 dias, 14 dias e 21 dias) após tratamentos.....	68
Tabela 11 –	Efeito do ácido elágico (AE) em diferentes concentrações sobre os parâmetros eritrocitários e leucograma de camundongos Swiss.....	69
Tabela 12 –	Efeito do ácido elágico (AE) sobre a massa média dos órgãos dos animais tratados com diferentes concentrações.....	70

Figura 01 –	<i>Punica granatum</i> Linnaeus – (A), folhas – (B), flores vermelho alaranjadas – (C), fruto <i>in natura</i> da Romã – (D).....	24
Figura 02 –	Propriedades etnofarmacológica do extrato do fruto e casca de romã..	25
Figura 03 –	Estrutura molecular do ácido elágico.....	31
Figura 04 –	Diferentes efeitos de xenobióticos nos eritrócitos.....	33
Figura 05 –	Eritrócitos como modelo para avaliar os efeitos citogenotóxicos de xenobiótico.....	33
Figura 06 –	Mecanismos anticâncer de compostos fenólicos de produtos naturais durante a carcinogênese.....	35
Figura 07 –	Formação de micronúcleo.....	36
Figura 08 –	Eritrócito Policromático Micronucleado (EPCMN).....	37
Figura 09 –	Estrutura química da Doxorrubicina.....	38
Figura 10 –	Camundongos Swiss (macho) com 6 – 7 semanas.....	42
Figura 11 –	Acondicionamento dos camundongos Swiss por grupo de tratamento - A e B.....	43
Figura 12 –	Concentrações do extrato hidroetanólico da casca do fruto de <i>Punica granatum</i> Linnaeus - (A) e concentrações do ácido elágico - (B).	43
Figura 13 –	Esfregaço sanguíneo (A) e secagem das lâminas a temperatura ambiente(B).....	46

Figura 14 –	Fixação das amostras com metanol - (A); Lâminas coradas com Giemsa prontas para análises - (B).....	46
Figura 15 –	Eritrócitos Normocromáticos – ENC - (A); Eritrócitos Policromáticos - EPC -(B); Eritrócitos Policromáticos Micronucleados - EPCMN - (C)....	47
Figura 16 –	Armazenamento dos órgãos (fígado, baço, coração, rim direito e rim esquerdo) em solução de formol 10% dissolvido em tampão fosfatado	49
Figura 17 –	Massa corpórea média dos animais tratados com diferentes concentrações do extrato hidroetanólico da casca da fruta de <i>Punica granatum</i> Linnaeus durante 21 dias, sobre a Massa Inicial - (A) e Massa Final - (B). Os valores foram expressos como Média $\pm$ Desvio padrão. Não houve diferença estatística significativa entre os grupos avaliados em comparação com o grupo controle (ANOVA e Teste de Tukey). DXR: Doxorubicina.....	52
Figura 18 –	Frequências de eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCMNs) tratados com diferentes concentrações do extrato hidroetanólico da casca da fruta de romã + DXR (24 e 48 horas) e seus respectivos controles. Os valores foram expressos como Média $\pm$ Desvio padrão. Houve diferenças estatísticas significativas entre os grupos tratados com o grupo DXR em comparação aos grupos de tratamento (ANOVA e Teste de Tukey). EPCs: Eritrócitos Policromáticos; DXR: Doxorubicina.....	55
Figura 19 –	Análise histopatológica do fígado	60
Figura 20 –	Análise histopatológica do baço.....	60
Figura 21 –	Análise histopatológica do coração.....	61
Figura 22 –	Análise histopatológica dos rins.....	61
Figura 23 –	Massa corpórea média dos animais tratados com diferentes concentrações do ácido elágico, massa Inicial (A) e Massa Final (B). Os valores foram expressos como Média $\pm$ Desvio padrão. Não houve diferença estatística significativa entre os grupos avaliados em comparação com o grupo controle (ANOVA e Teste de Tukey).....	63

Figura 24 –	Frequências de eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCMNs) tratados com diferentes concentrações do ácido elágico + DXR (24 e 48 horas) e seus respectivos controles. Os valores foram expressos como Média $\pm$ Desvio padrão. Houve diferenças estatísticas significativas entre os grupos tratados com o grupo DXR em comparação aos grupos de tratamento (ANOVA e Teste de Tukey).....	66
Figura 25 –	Análise histopatológica do fígado.....	71
Figura 26 –	Análise histopatológica do baço.....	71
Figura 27 –	Análise histopatológica do coração.....	72
Figura 28 –	Análise histopatológica dos rins.....	72

LISTA DE ANEXOS

Anexos 01 –	Relação Nacional de plantas medicinais de interesse ao SUS – RENISUS.....	89
Anexos 02 –	Parecer do Comitê de Ética.....	90
Anexos 03 –	Comprovante de submissão na Journal of Ethnopharmacology do Manuscrito: Cytogenetic and toxicological effects of <i>Punica granatum</i> Linnaeus fruit peel hidroethanolic extract in mice.....	91
Anexo 04 –	Manuscrito: Protective effect of ellagic acid against doxorubicin-induced genotoxicity in polychromatic erythrocytes.....	108
Anexo 05 –	Manuscrito: Potencial genotóxico e alterações histopatológicas em camundongos Swiss tratados com Doxorubicina: toxicidade aguda.....	124

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

%	Porcentagem
±	Mais ou menos
µg	Microgramas
°C	Grau Celsius
AE	Ácido elágico
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CEMIB	Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
Cm	Centímetro
CN	Controle Negativo
CP	Controle Positivo
DP	Desvio padrão
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DXR	Doxorrubicina
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ENC	Eritrócito Normocromático
EPCMN	Eritrócitos Policromáticos Micronucleados
EROs	Espécies reativas de oxigênio
EPC	Eritrócitos Policromático
ECFPG	Extrato hidroetanólico da casca da fruta de <i>Punica granatum</i> Linnaeus
g	Grama
HAMAB	Herbário Amapaense
HCT	Hematócrito

HBG	Hemoglobina
HPLC	High performance liquid chromatography
IEPA	Instituto de Estudos e Pesquisas do Estado do Amapá
i.p.	Intraperitoneal
IDN	Índice de divisão nuclear
Kg	Quilograma
m	metro
mg	Miligramas
mL	Mililitro
MN	Micronúcleo
MR	Massa relativa
MS	Ministério da Saúde
PG	<i>Punica granatum</i> L.
PMs	Plantas medicinais
p.c.	Peso corpóreo
PNPIC	Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares
PNPMF	Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos
RENISUS	Relação Nacional de plantas medicinais de interesse ao Sistema Único de Saúde
RBC	Eritrócitos totais
SP	São Paulo
SUS	Sistema Único de Saúde
TACO	Tabela Brasileira de Composição de Alimentos
v.o	Via oral
UFC	Universidade Federal do Ceará
UNIFAP	Universidade Federal do Amapá
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas

Estudo do extrato hidroetanólico de *Punica granatum* Linnaeus e do ácido elágico sobre os parâmetros citogenéticos e toxicológicos em camundongos Swiss

Introdução: A *Punica granatum* Linnaeus (Lythraceae) conhecida popularmente como romã, é amplamente distribuída por todo Brasil, possui uma rica fonte de polifenóis bioativos, dentre os quais se destaca: o ácido elágico (AE). Tanto a romã quanto o AE possuem diversas atividades biológicas comprovadas, tais como: efeito anti-inflamatório, antioxidante e anticarcinogênica. **Objetivos:** Avaliar os parâmetros citogenéticos e toxicológicos do extrato hidroetanólico da casca do fruto de *Punica granatum* Linnaeus (ECFPG) e do AE em eritrócitos policromáticos de camundongos Swiss. **Metodologia:** Foram utilizados quatro diferentes concentrações do ECFPG (700, 350, 175 e 87,5 mg/Kg por peso corpóreo - p.c.) e do AE (10,5, 5,3, 2,7 e 1,4 mg/kg p. c.), incluindo os grupos controle negativo, onde os animais foram tratados com água e o grupo de controle positivo tratou-se com doxorrubicina (DXR = 15 mg / kg por p.c.). Feito o tratamento, após 24 e 48 horas; 7; 14 e 21 dias, foram avaliados os possíveis efeitos citotóxicos, genotóxicos e antigenotóxicos pelo teste de micronúcleo. Foram realizadas, diariamente, a mensuração da massa corpórea, análise hematológica e histopatológicas. **Resultados e discussão:** O ECFPG e o AE não demonstraram efeitos genotóxicos e citotóxicos, porém, evidenciamos uma grande atividade antigenotóxica, protegendo assim o material genético de danos em todas as concentrações testadas. Nenhuma alteração significativa foi observada (massa corpórea, hematológicos e massa relativa dos órgãos), entretanto, o AE na concentração de 5,3 mg/kg, p.c apresentou uma alteração significativo da massa relativa do fígado. Neste contexto e com as análises histopatológicas, evidenciamos uma fraca toxicidade de ambos com o uso frequente dessas substâncias neste estudo. **Conclusão:** Os resultados mostraram que o ECFPG e o AE não apresentou efeito genotóxico, citotóxico e não altera os parâmetros hematológicos. Entretanto, possuem um potente efeito antigenotóxico, sendo considerados excelentes produtos na quimioprevenção de doenças relacionados a danos oxidativos.

Palavras-Chave: Pomegranate; Antigenotoxicidade; Micronúcleo; Ácido elágico; toxicidade.

Agradecimentos: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) / Fundação de Amparo à Pesquisa do Amapá (FAPEAP), Universidade Federal do Amapá (UNIFAP) e Centro Universitário Unichristus.

Study of the hydroethanolic of *Punica granatum* Linnaeus and ellagic acid and on cytogenetic and toxicological parameters in Swiss mice.

Introduction: The *Punica granatum* Linnaeus (Lythraceae) popularly known as pomegranate, is widely distributed throughout Brazil, has a rich source of bioactive polyphenols, among them: ellagic acid (EA). Both pomegranate and EA have a number of proven biological activities, such as: anti-inflammatory, antioxidant and anticarcinogenic effect. Objectives: To evaluate the cytogenetic and toxicological parameters of the hydroethanolic extract from the fruit house of *Punica granatum* Linnaeus (ECFPG) and EA in polychromatic erythrocytes of Swiss mice. **Methodology:** Were used four different concentrations of ECFPG (700, 350, 175, 87,5 mg/kg body weight – b.w.), and the EA (10.5, 5.3, 2.7 e 1.4 mg/kg b.w.), including the negative control group, where the animals were treated with water and the positive control group, treated with doxorubicin (DXR = 15 mg/kg per b.w.). At the end of treatment, after 24 and 48 hours; 7; 14 and 21 days were evaluated the possible cytotoxic effects genotoxic and antigenotoxic by the micronucleus test. Were done, diary, the measurements from the body mass, hematological and histopathological analyzes. **Results and Discussion:** ECFPG and EA did not show genotoxic effects, however, we showed a great antigenotoxic activity, thus protecting the genetic material from damages in all concentrations tested. No significant changes were observed (body mass, hematological and related to liver), meanwhile the EA at the concentration of 5.3 mg/kg b.w. showed a significant alteration of liver mass. In this context and with histopathological analyzes, we showed a low toxicity of both with the frequent use of these substances in this study. **Conclusions:** Our results showed that ECFPG and EA are not genotoxic, cytotoxic and do not change the hematological parameters. However, It presented a potent antigenotoxic effect, being considered excellent products in the chemoprevention of diseases related to oxidative damages.

Keywords: Pomagranate; Antigenotoxicity; Micronucleus; Ellagic Acid; Toxicity; Chemoprevention.

Acknowledgements: Coordination for Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) / Amapá Research Support Foundation (FAPEAP), Federal University of Amapá (UNIFAP) and Unichristus University Center.

Avaliando o contexto histórico, observa-se a utilização de plantas com fins terapêuticos sendo uns dos primeiros recursos utilizados pelas civilizações, esses conhecimentos eram adquiridos através da observação dos efeitos colaterais, que em muitos casos levavam à morte dos indivíduos. No decorrer do tempo, esses conhecimentos foram sendo aprimorados, enriquecidos e transmitidos através das gerações, formando assim, um grande banco de dados sobre as verdadeiras e/ou as possíveis propriedades etnofarmacológicas de diferentes plantas ditas como medicinais (FEITOSA et al., 2016).

No Brasil, principalmente na bacia amazônica, região norte do país, encontra-se uma vasta biodiversidade, incluindo plantas medicinais que em sua grande maioria ainda são desconhecidas e não estudadas cientificamente, essas plantas possuem em diversas partes de seus órgãos substâncias que podem ser utilizadas para fins terapêuticos ou que sejam precursoras de semissíntese químico-farmacêutica (BREITBACH, et al., 2013; MANSOURIAN et al.; 2014; LIMA; NASCIMENTO; SILVA, 2016; COLARES et al., 2017).

Sendo assim, a escolha da planta deve ser realizada através de estudos etnobotânicos, porém, a seleção ideal deve ser baseada em estudos complexos e extensos sobre a constituição fitoquímica e seus possíveis efeitos farmacológicos e toxicológicos sobre os seres humanos (OLIVEIRA, 2016). Entretanto, este potencial para a descoberta de plantas com atividades farmacológicas e seus efeitos toxicológicos é pouco explorado ou regulamentado, contrastando com o que ocorre em países desenvolvidos (NASCIMENTO JÚNIOR et al., 2016; MORAES, 2017).

Devido a esses fatores, e ao fato de que os extratos vegetais apresentam como vantagem o baixo custo, o Ministério da Saúde (MS), com base em seu Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos – PNPMF, elaborou uma Relação Nacional de plantas medicinais de interesse ao Sistema Único de Saúde - RENISUS (Anexo 01) com o objetivo de orientar estudos e pesquisas para assegurar a eficácia e a segurança na utilização dessas plantas ditas como medicinais, além disso, estimulou a população a utilizar plantas e fitoterápicos, incluindo as mesmas como opção terapêuticas no Sistema Único de Saúde – SUS, por meio da portaria GM nº 971/2006 (Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares - PNPIC) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009; ARGENTA et. al., 2012; SGUAREZI et al., 2017).

Neste contexto, estudos utilizando plantas medicinais contribuem para descobertas de novas substâncias com diferentes sítios de ações e efeitos biológicos, desta maneira, a *Punica granatum* Linnaeus, possui diversas atividades, principalmente em sua casca, entre esses efeitos, cita - se: ação contra bronquite, malária (SHIBAN; AL-OTAIBI; AL- ZOREKY, 2012), efeitos antibacteriana (Bacteriostático e Bactericida), anti-inflamatório, antioxidante e anticancerígena (SUDHEESH; SOUMYA; JAMES, 2018).

Essas atividades biológicas identificadas na *Punica granatum* Linnaeus são produzidas por diferentes compostos bioativos presentes no mesmo. Jain (2011) e colaboradores identificaram e isolaram quatro compostos, como punicalina, punicalagina, ácido gálico e ácido elágico (AE). Tendo como maior foco o ácido elágico, por desempenhar a grande maioria desses efeitos terapêuticos, principalmente a atividade antioxidante (ELFALLEH, et al., 2009).

O AE é um polifenol descrito na categoria de elagitanino, assim como os demais taninos, são produzidos pelo sistema de defesa da planta contra o ataque microbiano e de animais, além disso, nos organismos humano e de mamíferos, apresentam diversos resultados favoráveis (MANSOURIAN et al., 2014; COLARES et al., 2017).

Embora os usos de *Punica granatum* Linnaeus e do AE sejam bastante difundidos para fins terapêuticos, deve-se tomar todo o cuidado, pois pouco se sabe a respeito de seus efeitos citogenéticos e toxicológicos, tanto para o homem quanto para os mamíferos, carecendo assim, de mais estudos abordando este contexto (BRAQUEHAIS, et al., 2016).

Neste sentido, há grande relevância de se avaliar seus níveis de produzir efeitos genotóxico, antigenotóxico, citotóxico e toxicológicos, garantindo assim, uma segurança maior para a população que faz uso dessa planta ou dessa substância - (AE) de forma isolada ou de produtos que contenham a mesma em sua constituição fitoquímica. Justamente esses fatores motivaram a realização deste estudo em investigar essas propriedades citogenéticas e seus efeitos toxicológicos em eritrócitos policromáticos de camundongos Swiss com a utilização subaguda do extrato hidroetanólico da casca da fruta de *Punica granatum* Linnaeus (ECFPG) e do AE.

1.1. *Punica granatum* Linnaeus

A romã (*Punica granatum* Linnaeus) é considerada uma das mais antigas frutas comestíveis conhecidas e amplamente distribuída por todo Brasil (CALZONE et al., 2019),

a mesma pertence à família Lythraceae, sendo conhecida popularmente por diferentes nomes, tais como: “romãzeira”, “romeira” e “granado”, nativa do Afeganistão, Irã, China e do subcontinente indiano (SILVA et al. 2013; MPHAHLELE et al., 2014).

A romãzeira (Figura 01) possui um porte médio, variando de 2 – 10 m, tronco curto e casca fina, podendo ser ramificada ou não, com ramos de coloração acinzentada quando adulto e marrom-avermelhada quando juvenil, possui umas folhas verde clara relativamente pequenas (3 - 7 cm), suas flores de coloração vermelho alaranjado são terminais ou axilares, isoladas ou agrupadas (2 - 3 flores), além disso, possui um fruto (baga de 5 - 12 cm), globosa, com cálice proeminente, não climatérico, resistente ao armazenamento e transporte, além de ser considerado uma deliciosa fruta consumida em todo o mundo (FERREIRA, 2017).

Figura 01. *Punica granatum* Linnaeus – (A), folhas – (B), flores vermelho alaranjadas – (C), fruto *in natura* da Romã – (D).



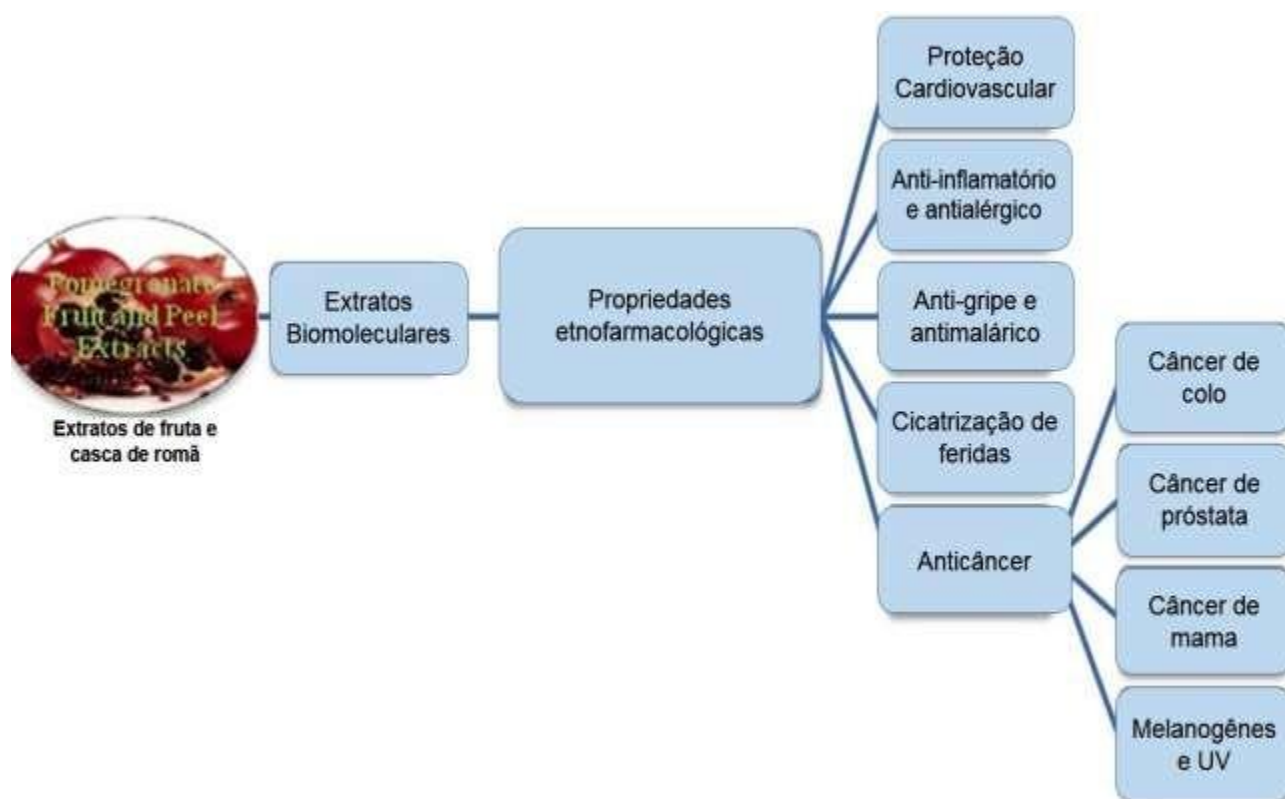
Fonte: Serralves (2018).

A romã possui uma mistura de vários compostos bioativos que desempenham diversas propriedades etnofarmacológicas. Essas propriedades são descritas extensivamente por diferentes estudos, com o objetivo de demonstrar que diversas partes de *Punica granatum* Linnaeus possuem diferentes efeitos, principalmente em sua casca (Fruta) - (Figura 02), por esse motivo, há anos vem sendo amplamente usada como fitoterápico pela população (BAPODARA; NAGANI; CHANDA, 2011; LOIZZO et al. 2019; RAVIKUMAR et al. 2019).

Devido a esse fator crucial, vem sendo valorizado por diferentes culturas, no Egito, vem sendo utilizado no tratamento de várias doenças, como inflamação, tosse e infertilidade (ISMAIL, SESTILI, AKHTAR, 2012; ÇAVDAR et al., 2017), na China é amplamente utilizado como analgésico e antipirético (LEE, et. al., 2010).

Outros efeitos também já foram descritos com o uso da casca de romã, tais como: atividade anticoccidial (AHAD, et al., 2018), antimicrobiana (ELBATANONY, et al., 2019), lesões gástricas induzidas por etanol (GONZÁLEZ-TRUJANO, et al., 2015). Além disso, pesquisas também demonstram que o consumo do suco de romã atua sobre o estresse oxidativo, possuindo atividade antioxidante (ELFALLEH, et al., 2009) e efeitos anticâncer (KHWAIRAKPAM, et al. 2018).

Figura 02: Propriedades etnofarmacológica do extrato do fruto e casca de romã.



Fonte: Adaptado de Ismail, Sestili e Akhtar (2012).

Deste modo, buscando entender melhor e comprovar cientificamente suas ações terapêuticas, diversos estudos abordam esses efeitos biológicos de diferentes partes da romã contra diversas patologias. Das et al. (1999), avaliou o extrato metanólico de sementes de romã, e comprovaram sua atividade antidiarreico. Bhaskar e Kumar (2012), evidenciaram reduções nos níveis de hemoglobina glicosilada, além de efeito estimulatório sobre a insulina com a utilização de extratos aquosos e etanólicos de flores de *Punica granatum* Linnaeus.

Além disso, Bekir et al. (2013), confirmaram que os extratos etanólicos de folhas de romã, possui elevada atividade antioxidante. Ao analisarem diferentes porções do fruto, Salgado et al. (2012) verificaram que o extrato seco da casca de romã possui atividade antioxidante em quantidade superior de compostos quando comparado com as sementes e polpa do fruto.

Avaliando o extrato metanólico da casca da romã em células de câncer de mama humano MCF-7, Dikmen, Ozturk e Ozturk (2011), evidenciaram um efeito anti- proliferativo, demonstrando o potencial uso deste fruto na prevenção desta doença. Segundo Nair et al. (2011), o óleo das sementes e extrato padronizado do suco e da casca de romãzeira possuem atividades antitumorais. Esses dados corroboram com estudos realizados por Aharoni et al. (2015), Banihani et al. (2013), afirmando que as diversas partes da romã são indicadas e usadas para o tratamento de um grande número de doenças.

Portanto, o uso de romã na dieta, auxiliaria em uma vida mais saudável, protegendo contra o surgimento de células cancerígenas, atuando como um quimioterápico eficaz sem efeitos colaterais tóxicos (KHWAIRAKPAM, et. al., 2018).

Além do seu uso medicinal, tem ampla aplicação na indústria de alimentos, com a fabricação de sucos, popularmente consumido *in natura*, sendo que a parte comestível de frutas inteiras contém 75-85% de suco e 15-25% de sementes (doces e geleias), já na indústria de cosméticos, na fabricação de sabonetes, hidratantes, shampoos e condicionadores, além disso, vem sendo utilizados como aromatizantes e corante (PEREIRA, 2015; ÇAVDAR et al., 2017).

Neste contexto, principalmente pelo excepcional efeito terapêutico da casca de romã, a comunidade científica internacional incentivou - se a buscar e expandir novos estudos relacionados a esta planta de uso medicinal nessas últimas décadas, com o intuito de conhecer melhor seus potenciais efeitos terapêuticos para a saúde da população, melhorando assim, o bem-estar coletivo (ISMAIL; SESTILI; AKHTAR, 2012).

111 Composição centesimal na romã

Avaliar as propriedades de um alimento envolve características físico – química e sensorial dos mesmos. A partir da determinação da composição centesimal, podemos definir os teores de carboidratos, proteínas, lipídios, vitaminas e minerais. Desta maneira, alterações de alguns desses compostos (excessos ou deficiências) podem desencadear alterações na produção de metabólitos secundários, ocorrendo assim, distúrbios metabólicos. Dentre os compostos presentes na romã (Tabela 01), os carboidratos são os componentes mais abundante (TACO, 2011).

Tabela 01: Composição da *Punica granatum* Linnaeus (Romã) *in natura* por 100 gramas de parte comestível: Centesimal, minerais, vitaminas e colesterol.

CONSTITUINTES	Composição da <i>Punica granatum</i> Linnaeus (Romã) crua por 100 gramas
Carboidratos	15,1 g
Proteínas	0,4 g
Fibra alimentar	0,4 g
Manganês	0,13 mg
Fósforo	40 mg
Ferro	0,3 mg
Sódio	1 mg
Potássio	485 mg
Cobre	0,19 mg
Zinco	0,7 mg
Cálcio	5 mg
Magnésio	13 mg
Tiamina	0,12 mg
Riboflavina	0,17 mg
Piridoxina	0,05 mg
Vitamina C	8,1 mg

Fonte: Adaptado da Tabela Brasileira de Composição de Alimentos - TACO (2011).

Desta maneira, cada composto apresenta determinadas funções para o equilíbrio metabólico da planta, dentro desta vasta gama de componentes, os carboidratos fazem parte do grupo de macromoléculas mais abundantes da natureza, são conhecidos pela humanidade desde a antiguidade, atuando como fonte de energia para o organismo, participa na sinalização entre as células e na colaboração da interação entre moléculas. Os mesmos possuem tanta importância que a comunidade científica criou uma área específica para o desenvolvimento de pesquisas que envolva o mesmo, a glicobiologia (DE CARVALHO; XAVIER, 2018).

Outro mineral de suma importância é o fósforo, o mesmo está presente em diversos organismos, tendo como função a participação nos processos metabólicos, transporte de energia, composição da membrana celular e do material genético. O mesmo é encontrado naturalmente em diversos alimentos, na forma de fosfato orgânico (FELIX; DE MEDEIROS; MOLINA, 2018).

Dentre os compostos presentes na romã encontra-se também o potássio, um dos nutrientes solicitado de maior quantidade pelas plantas, mesmo não tendo participação em nenhuma estrutura orgânica. A mesma apresenta diversas funções no metabolismo celular, como a ativação da catálise biológica, ativação enzimática, regulação osmótica e a promoção da síntese do açúcar e seu transporte aos tecidos (GONÇALVES, 2018).

1.12 Metabólitos secundários na romã

A maioria das plantas produz naturalmente uma grande variedade de moléculas bioativas, denominadas metabólitos secundários, que podem ser obtidas a partir de diferentes partes das plantas (raízes, folhas, caule, flores e frutos), essas substâncias desempenham diversas funções para o organismo, como por exemplo: proteção contra predadores, atratores voláteis - facilitando a polinização, fornecimento de cor às plantas, dentre outras (GUL; SHINWARI; AFZAL, 2012; KHAN, et al., 2017). Porém, esses metabólitos apresentam efeitos biológicos nos seres humanos (SAOUD, et al., 2019).

Neste contexto, esses compostos podem atuar de diferentes formas no organismo, proporcionando diversos efeitos biológicos, como por exemplo, diminuição da glicose no sangue, proteção contra doenças cardiovasculares, hipercolesterolemia (SEPÚLVEDA, et al., 2016), efeito antibacteriana, anti-inflamatório, atividade antioxidante e anticancerígena (SUDHEESH; SOUMYA; JAMES, 2018), desta maneira são explorados e avaliados devidos, em sua maioria, aos efeitos benéficos à saúde humana.

Portanto, os metabólitos secundários não são necessariamente produzidos sob todas as condições, como ocorre nos metabólitos primários, como exemplo de metabólitos secundários tem os alcalóides, os terpenos e os flavonoides, estes últimos representam uma classe química de larga ubiquidade no grupo das substâncias fenólicas de origem vegetal (DE OLIVEIRA et al., 2015).

Desta maneira, a romã possui uma rica fonte de taninos bioativos que são classificados como polifenóis, derivados do metabolismo secundário desta planta, tem alta solubilidade em água e quimicamente reativos, sendo a maior parte derivada do metabolismo da glicose por diferentes reações bioquímicas. Estes compostos são encontrados em toda a planta, principalmente no fruto e na folha (PEREIRA, 2015; MORAES, et al., 2017).

Sendo assim, diversos estudos buscam identificar os compostos de diferentes partes dos extratos de romã e relacionar com seus efeitos biológicos. Os frutos de romã apresentam uma casca que abrange cerca de 26 - 30% do peso total dos frutos e caracteriza-se por uma grande quantidade de metabólitos secundários, como compostos fenólicos, incluindo flavonoides e taninos hidrolisáveis, desta maneira, as cascas e sucos de romã comparadas com outras partes da planta, apresentam uma concentração bastante elevada desses compostos, sendo diretamente ligado com aproximadamente 92% da atividade antioxidante (ISMAIL; SESTILI; AKHTAR, 2012).

Segundo Saad et al. (2012) a casca e a semente de romã contêm diversos compostos antioxidantes como o tanino (punicalagina). Um estudo realizado por Hmid et al. (2017), identificaram e quantificaram os compostos fenólicos por análise de High performance liquid chromatography - HPLC em sucos de romã, sendo encontrado um total de 10 compostos fenólicos (ácidos hidroxibenzoicos, tais como ácidos gálico e elágico, ácidos hidroxicinâmicos, tais como ácidos clorogénico, cafeico e ferúlico, flavan-3-óis como catequina e epicatequina, di-hidrochalconas como a florizina, flavonóis como a quercetina e flavonol, glicosídeos como a rutina), esses compostos foram encontrados em quantidades menores, exceto os ácidos elágico e gálico.

No estudo realizado por Silva (2017) com o extrato hidroetanólico da casca da fruta de *Punica granatum* Linnaeus, o mesmo extrato utilizado nesta pesquisa, foi possível identificar 18 compostos (Tabela 02), tendo como maior foco os fitocomplexos: ácido elágico, ácido gálico, punicalagina. Portanto, estudos genotóxicos e toxicológicos são considerados de suma importância para avaliar os efeitos decorridos destes metabólitos secundários, como o ácido elágico, que são derivados principalmente de plantas medicinais como a casca de romã.

Tabela 02 - Valores de massa/carga (m/z) obtidos em ensaio de HPLC-HRMS (ESI) para a amostra de *Punica granatum* L. (Identificação confirmada usando padrões comerciais).

Compostos	Fórmula molecular calculada	[M-H] ⁻ calculado	[M-H] ⁻ observado (tr em minutos)	Erro (ppm)
Ácido elágico	C ₁₄ H ₆ O ₈	301,-----	301,0341?	
Ácido málico	C ₄ H ₆ O ₅	133,00137	133,0136 (0,4)	
Ácido gálico	C ₇ H ₆ O ₅	169,0137	169,0128 (0,6)	
Aldeído siríngico	C ₉ H ₁₀ O ₄	181,0501	181,0516	
Ácido siríngico	C ₉ H ₁₀ O ₅	197,0450	197,0444 (2,2)	
Floretina	C ₁₅ H ₁₄ O ₅	273,0763	273,0764	
Ácido punícico	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	277,2168		
Catequina e epicatequina	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	289,0712	289,0709	
Galocatequina	C ₁₅ H ₁₄ O ₇	305,0661	305,0677	
Dihidromiricetina	C ₁₅ H ₁₂ O ₈	319,0454	319,0450	
Punicaflavonol	C ₁₆ H ₁₄ O ₁₀	365,0509	365,0502	1,9
Ácido elágico pentosídeo	C ₁₉ H ₁₄ O ₁₂	433,0407	433,0399	1,8
Floretina hexosídeo	C ₂₈ H ₃₆ O ₄	435,2535	435,2495	9,2
Corilagina	C ₂₇ H ₂₂ O ₁₈	633,0728	633,0703 (0,7; 0,9; 1,4 e 1,7)	3,9
Punicalinas isômeros	C ₃₄ H ₂₂ O ₂₂	781,0524	781,0511 (0,6)	1,7
Pedunculaginas isômeros	C ₃₄ H ₂₄ O ₂₂	783,0681	783,0674 (1,0; 1,2)	0,9
Punicalaginas isômeros	C ₄₈ H ₂₈ O ₃₀	1083,0587	1083,0568 (1,0; 1,2)	1,8
Punicalagina-like	C₄₈H₃₀O₃₁	1101,0693	-	

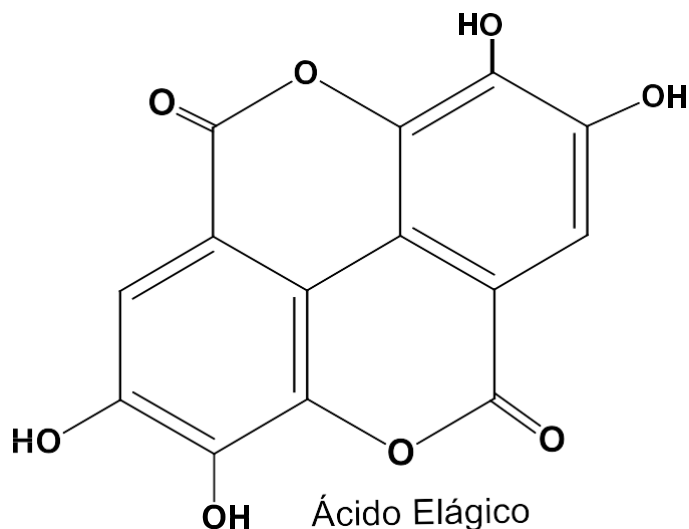
Fonte: Silva (2017).

1.2. ÁCIDO ELÁGICO

O ácido elágico (AE - C₁₄ H₆ O₈) (Figura 3), quimicamente é uma lactona fenólica pertencente ao grupo dos taninos hidrolisáveis, possuindo característica plana contendo quatro grupos hidroxila e dois grupos lactona, presentes em diversos alimentos vegetais,

principalmente em frutas como nozes, morango, framboesa, uvas e amoras e em plantas medicinais como, *Ficus glomerata* Roxb e *Punica granatum* Linnaeus. O mesmo pode estar presente na parte da estrutura da membrana e parede celular vegetal na forma livre ou formando grandes complexos de ácido elágico com glicoses denominadas elagitaninos. (DALVI, 2014; GONZÁLEZ-SARRÍAS, et al., 2015; MORAES, 2017).

Figura 03: Estrutura molecular do ácido elágico.



Fonte: ChemDraw Professional (imagem própria - 2019).

Suas funções fisiológicas vão além do bem-estar da própria planta, possibilitando diversos efeitos biológicos para o organismo humano. Kasai et al. (2006), comprovaram que o consumo (16 dias) de um extrato de romã contendo 100 mg de ácido elágico é capaz de produzir efeitos protetores e benéficos na pigmentação da pele (humana) após a irradiação com raios ultravioletas. Além disso, é relatado que o ácido elágico apresenta outros efeitos, tais como: cicatrizantes (AL-OBAIDI, et al., 2014), anti-hemorragico (GOPALAKRISHNAN, et al., 2014), atividade bacteriostática e bactericida (*S. aureus* e *P. aeruginosa*) e uma alta atividade antioxidante (TAVARES, et al., 2018).

Esses efeitos podem estar relacionados com a capacidade antioxidante que esse composto desempenha, seja pelo mecanismo de sequestro de radicais livres ou pelo quelante de íons metálicos (LARROSA, et al., 2010; DALVI, 2014), desta forma, podem atuar contra o estresse oxidativo, uns dos principais responsáveis por ocasionar danos oxidativos no organismo, além de atuar indiretamente na ativação dos sistemas enzimáticos celulares antioxidantes (MEHRZADI, et al., 2018).

Desta forma, o estresse oxidativo surge do desequilíbrio entre as produções de espécies reativas de oxigênio (EROs), podendo causar danos graves as proteínas, lipídios, material genético e até mesmo resultar na morte celular. De tal modo, os

excessos de radicais livres são considerados um perigo para a saúde humana, podendo desencadear inúmeras doenças cardiovasculares, renais e o surgimento do próprio câncer (WANG, ZHAO, 2019). Por essa razão, os efeitos produzidos pelo ácido elágico na prevenção de doenças relacionadas à oxidação têm sido amplamente estudados.

Embora vários estudos tenham focados em diferentes atividades biológicas do ácido elágico, pouco foco foi dado aos efeitos sobre o material genético. Sabe-se que o AE podem induzir apoptose e inibir a proliferação de vários tipos de células cancerígenas *in vitro* e *in vivo*. (BOEHNING, et al., 2018). Como tal, o AE atrai um interesse significativo como um potencial composto quimioterapêutico, podendo proporcionar uma qualidade de vida melhor a saúde humana, além disso, estudos focados nesta substância, podem contribuir para o conhecimento sobre os verdadeiros efeitos do AE no organismo.

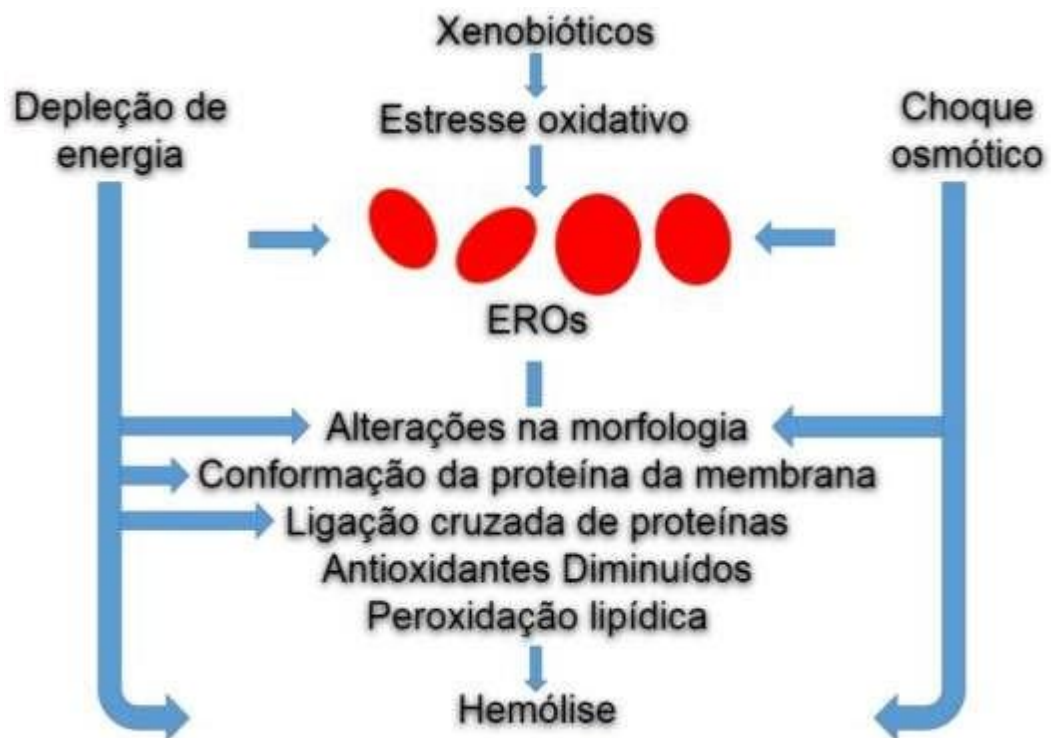
1.3. MODELO DE ANÁLISE CITOGENOTÓXICO E GENÉTICA TOXICOLÓGICA

Os glóbulos vermelhos (eritrócitos), são considerados uma das principais células do corpo humano. Em mamíferos, os eritrócitos apresentam uma característica morfológica bastante específica, sendo desprovidas de núcleos e outras organelas celulares, constituída por uma membrana plasmática com composição e estrutura específicas altamente correlacionadas com suas funções biológicas (oxigenação do organismo através do transporte de O₂ e CO₂), além de possui um tempo de vida de aproximadamente 120 dias (MOHANDAS, CHASIS, SHOHET, 1983; FARAG; ALAGAWANY, 2018).

Neste contexto, diversas substâncias tóxicas (metais, pesticidas, agentes químicos, biológicos, irradiação, produtos naturais e alguns tipos de drogas) podem desencadear danos direto ou indireto ao citoesqueleto dos eritrócitos e alterar o metabolismo celular e sua permeabilidade iônica, desencadeando anormalidades em sua morfologia e consequentemente a morte celular (Figura 04).

Desta forma, os eritrócitos são desprovidos de estruturas de membrana interna e fáceis de serem isolados e manipulados, fornecendo um bom modelo para diferentes ensaios. Devida a esses fatores, diferentes estudos utilizam os eritrócitos como modelo para avaliar possíveis efeitos citogenotóxicos de diferentes substâncias, através da análise de diferentes parâmetros (Figura 05).

Figura 04: Diferentes efeitos de xenobióticos nos eritrócitos.



Fonte: Adaptado de Farag e Alagawany (2018).

Figura 05: Eritrócitos como modelo para avaliar os efeitos citogenotóxicos de xenobiótico.



Fonte: Adaptado de Farag e Alagawany (2018).

Çömelekoğlu (2000) e colaboradores, concluíram que alguns pesticidas podem desencadear alterações no tamanho e nas formas superficiais dos eritrócitos humanos. Além disso, Koç, et al. (2008) demonstraram os efeitos do malatião e do endossulfan *in vivo* (1,0 mg / kg de peso corporal por 15 dias) evidenciando defeitos estruturais e alterações nas formas superficiais das hemácias de ratos. Suwalsky et al. (2008), relataram que as hemácias humanas, quando incubadas com extrato aquoso (0,5 g de pó seco) de *Aristotelia chilensis* (0,5 mL de 1% de extrato), apresentavam alterações morfológicas representadas pela forma equinocítica.

Esses danos, em sua grande maioria, só podem ser detectados após exposição com esses produtos. Sendo assim, a genética toxicológica tem por objetivo detectar e entender as ações (endógenas e exógenas) de quaisquer agentes físicos, químicos ou biológicos que possam produzir esse efeito genotóxico sobre o material genético (ácido desoxirribonucleico - DNA) (FARAG; ALAGAWANY, 2018).

Neste contexto, o termo genotóxico se refere às alterações (mutações) letais e/ou hereditárias no DNA, que são transmitidas, tanto pelas células somáticas quanto pelas germinativas, e em sua grande maioria, podem desenvolver uma série de problemas maléficos, incluído o surgimento de câncer (iniciação, promoção, progressão, invasão e metástase) (DOLL; PETO, 1981; DA SILVA et al., 2011; DA FONSECA; PEREIRA, 2013; ESMOLAEVA; SCHUMACHER, 2014).

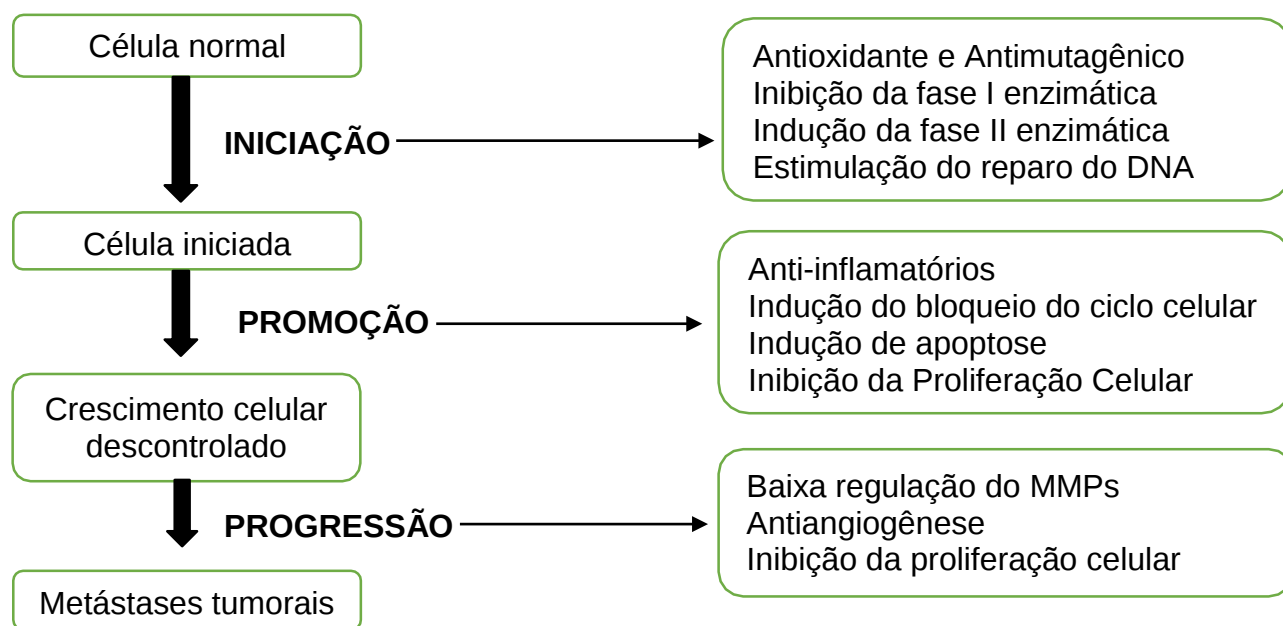
Essas mutações são classificadas basicamente em duas grandes categorias: mutações gênicas e cromossômicas. As mutações gênicas, são alterações que ocorrem na sequência de nucleotídeos do DNA do indivíduo e as cromossômicas são as que produzem alterações no número ou na estrutura dos cromossomos, nas quais são detectadas por análises citogenéticas (LUCIO NETO, 2011).

Para minimizar esses danos ao DNA, existem substâncias denominadas antimutagênicas, caracterizados como agentes que tem a capacidade de diminuir as frequências de mutações no material genético, deste modo, desempenham um papel fundamental na manutenção da transmissão de informações genéticas. Essas substâncias são classificadas como desmutagênicos, desempenhando a função de proteção contra substâncias mutagênicas antes de agirem sobre o DNA e as substâncias bio-antimutagênicas que são aquelas que age sobre os processos metabólicos de reparação (COSTA, 2018).

Neste contexto, as plantas medicinais são constituídas por diferentes compostos fenólicos, como descritos anteriormente, e possuem a capacidade de inibir a carcinogênese através de dois mecanismos: pela modificação do estado de redox e pela

ação sobre as funções celulares básicas, tais com inflamação, ciclo celular, angiogênese, apoptose, invasão e metástase (KAMPA *et al.*, 2007). Deste modo, algumas plantas medicinais podem intervir nas etapas da carcinogênese por meio desses mecanismos, minimizando assim, esses danos provocados por fatores externos ou internos ao organismo (Figura 06).

Figura 06: Mecanismos anticâncer de compostos fenólicos de produtos naturais durante a carcinogênese.



Fonte: Adaptado de Dai e Mumper (2010).

Além disso, podemos avaliar a toxicidade de uma substância através do tempo de exposição a esses produtos, com base nisto, a toxicidades é classificado como agudo, caracterizado pelo surgimento dos efeitos tóxicos em animais por uma única ou por múltiplas exposições a uma substância, por qualquer via, por curto período de tempo. A toxicidade subcrônica, em que os efeitos tóxicos são produzidos por exposições diárias repetidas a uma substância, com um período de aproximadamente 10% do tempo de vida de exposição do animal ou alguns meses, e a crônica, na qual os efeitos tóxicos ocorrem após repetidas exposições, por um período longo de tempo, geralmente durante toda a vida do animal ou aproximadamente 80% do tempo de vida (MORAIS, *et al.*, 2017).

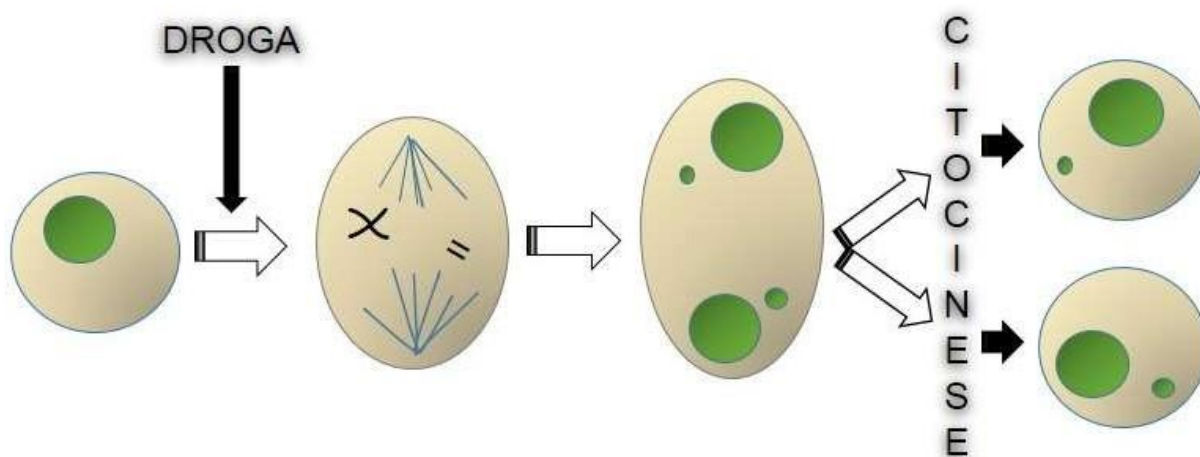
Logo, pesquisas de produtos naturais ou sintéticos que possuem ações biológicas favoráveis aos seres humanos e que apresentem em suas propriedades, um potencial antimutagênico, tem grande relevância, uma vez que, na atualidade é considerado um dos principais fatores que contribuem para a longevidade, além de prevenir e combater até mesmo o surgimento de tumores (COSTA, 2018).

131 Teste de micronúcleo

O Teste do Micronúcleo é um método simples na avaliação de diversos tipos de danos citogenéticos, detectando mutações cromossômicas do tipo clastogênica, aneugênica e danos no fuso mitótico. O mesmo foi desenvolvido por Matter e Schmid (1971), através de estudos realizados em eritrócitos de medula óssea de camundongo (*in vivo*) e posteriormente, Heddle (1976), realizou estudos (*in vitro*) em linfócitos do sangue periférico humano (QUEIROZ, 2017).

Desde modo, este teste é considerado um biomarcador sensível em condições de campo e em laboratório, fácil de ser realizado, possui um baixo custo e um resultado rápido, além de ser capaz de verificar o efeito citogenotóxico de diferentes substâncias, avaliando as instabilidades genéticas através da observação da formação de micronúcleos (MN) na interfase do ciclo celular, ou seja, este teste é usado rotineiramente *in vitro* e *in vivo* para detectar a atividade de substâncias químicas com efeitos clastogênicos que induzem fragmentos cromossômicos ou aneugênicos que interferem no aparato mitótico e levam à falta de segregação de cromátides ou cromossomos inteiros durante a mitose (Figura 07) (BEIRUTHY; KAZAN, 2016; FARAG; ALAGAWANY, 2018).

Figura 07: Formação de micronúcleo.



Fonte: Adaptado de Da Silva et al., 2011.

O MN é uma massa de cromatina extracelular envolvido por um envelope nuclear originada de fragmentos cromossômicos ou de cromossomos inteiros, que se perderam durante o processo de divisão celular. Sendo assim, efeitos de substâncias que provoquem danos no DNA, podem ser detectados a partir da formação de MN, pois a formação espontânea do mesmo é baixa e quase uniforme entre as espécies. (MENEGUETTI, et al., 2011; HINTZSCHE, et al., 2017).

O teste de micronúcleo apresenta as seguintes características básicas: o efeito do agente químico é observado em eritrócitos policromáticos (EPC), que são células anucleadas jovens, estes eritrócitos têm um tempo de vida relativamente curto, de modo que qualquer micronúcleo que ele apresente (eritrócito policromático micronucleado - EPCMN - Figura 08) deve ter sido gerado como resultado de danos cromossômicos induzidos recentemente (HAYASHI et al., 1989). As hemácias nucleadas de animais podem ser usadas para avaliar a genotoxicidade de diferentes xenobióticos usando micronúcleos (FARAG; ALAGAWANY, 2018).

Figura 08: Eritrócito Policromático Micronucleado (EPCMN)



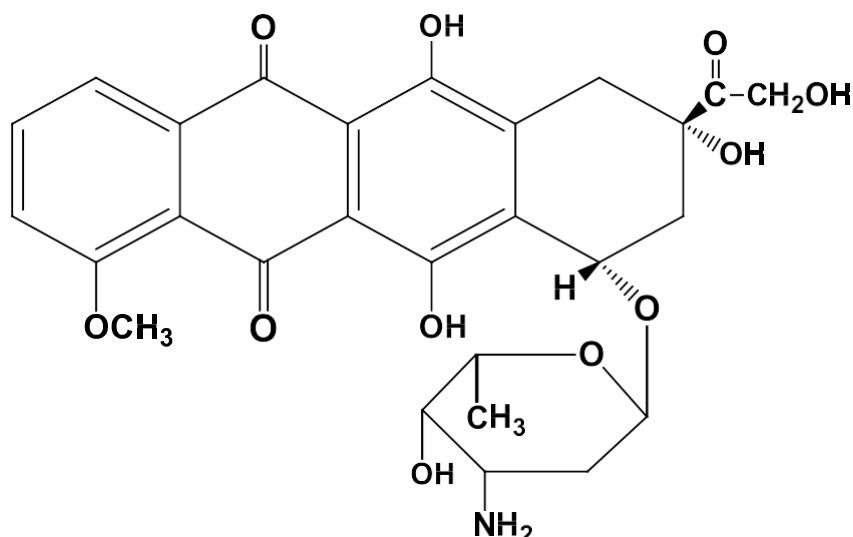
Fonte: Autor, 2018 (imagem própria).

132 Doxorrubicina

Em estudos de genética toxicológica, o uso de agentes indutores de danos no material genético como controle positivo é fundamental e recomendado em diversos protocolos (MACGREGOR et al., 1987). A inclusão desse controle é primordial para validar um teste experimental em modelos *in vivo* ou *in vitro*, além de mostrar o efeito de proteção de uma determinada substância (HERNANDES, et al., 2014).

Neste contexto, a Doxorrubicina ou Doxil® - DXR (Figura 09) é um potente fármaco quimioterápico de primeira linha baseado em antraciclinas, utilizada desde 1969 no tratamento de uma ampla gama de cânceres, incluindo cânceres sólidos e hematogênicos. Esse antibiótico foi descoberto a partir de uma cepa mutada de *Streptomyces peucetius* (RENU, et al., 2018; XU, et al., 2018).

Figura 09: Estrutura química da Doxorrubicina.



Fonte: ChemDraw Professional (imagem própria - 2019).

No avanço das pesquisas sobre o câncer, o interesse cresceu na topoisomerase II, após a descoberta de que é alvo de drogas anticâncer ativas, como a DXR (ROCHETTE et al., 2015). Sendo assim, existem diversos mecanismos de ação da DXR, como o envenenamento por topoisomerase II, decorrido da clivagem na fita dupla do DNA, inibindo assim a mesma (YANG, et al., 2014). Além desse mecanismo, a doxorubicina induz a inibição da síntese de proteínas e replicação de DNA pela capacidade de intercalar-se ao DNA, assim como pela geração de espécies reativas de oxigênio, levando a danos oxidativos no material genético (TOMASINI, 2018).

Apesar de seus efeitos terapêuticos, existem limitações ao seu uso, que vai desde a resistência a droga até efeito de cardiotoxicidade, que é um efeito colateral específico das antraciclinas, além de apresentar uma toxicidade aguda dentro de dois ou três dias após o seu uso e cardiotoxicidade crônica encontrada após várias semanas ou até vários meses após a administração da mesma (RENU, et al., 2018).

Acredita-se que a principal contribuição para o surgimento da cardiotoxicidade é a indução de formação de radicais livres e subsequente o estresse oxidativo, provocando a ativação das vias de sinalização apoptóticas e posteriormente, levando a danos nos cardiomiócitos (YUHONG, et al., 2018).

Atualmente, vários antioxidantes, como vitamina E, *N* - acetil cisteína e resveratrol, além daqueles provenientes de produtos naturais, foram identificados para desempenhar ações contra os efeitos tóxicos e até mesmo no próprio material genético induzido pela doxorubicina, de tal modo, a DXR vem sendo bastante utilizado como um agente indutor de danos no material genético para a verificação do efeito protetor de extratos de frutos como “turkey berry” (*solanum torvum*) e romã (*Punica granatum* L.) e até mesmo de

substâncias isoladas (ácido elágico) (HERNANDES, et al., 2014; LU, et al., 2018).

Desta maneira, com provas científicas sobre os danos no DNA provocados pela DXR em modelo *in vivo* (ALVES, et al., 2013; MONTEIRO NETO, et al., 2011; CARNEIRO, et al., 2017), este antitumoral foi utilizado neste estudo como controle positivo para avaliar o potencial efeito antígenotóxico da casca do fruto de *Punica granatum* Linnaeus e do ácido elágico em eritrócitos policromáticos de camundongos Swiss.

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial genotóxico, antígeno-tóxico e os possíveis efeitos toxicológicos do extrato hidroetanólico de *Punica granatum* Linnaeus (Romã) e do ácido elágico (AE) pelo sistema-teste *in vivo*.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar a frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados em camundongos Swiss tratados com diferentes concentrações do extrato hidroetanólico da casca da fruta de *Punica granatum* Linnaeus (ECFPG) e do ácido elágico (AE) para avaliar a genotoxicidade, e associadas com a Doxorubicina (DXR), para determinar o efeito antígeno-tóxico.
- Determinar a citotoxicidade do extrato hidroetanólico da casca da fruta de *Punica granatum* Linnaeus (ECFPG) e do ácido elágico (AE), através do Índice de Divisão Nuclear (IDN).
- Avaliar o efeito do extrato hidroetanólico da casca da fruta de *Punica granatum* Linnaeus (ECFPG) e do ácido elágico (AE) sobre os parâmetros hematológicos (série branca e série vermelha).
- Avaliar as características anatomopatológicas do fígado, baço, coração e rins dos animais submetidos aos tratamentos com extrato hidroetanólico da casca da fruta de *Punica granatum* Linnaeus (ECFPG) e do ácido elágico (AE).

3.1 OBTENÇÃO DO EXTRATO DE *Punica granatum* Linnaeus E DO ÁCIDO ELÁGICO

O extrato hidroetanólico da casca da fruta de *Punica granatum* Linnaeus (ECFPG) e o ácido elágico – AE (pureza $\geq 95\%$) - (Sigma-aldrich®, Saint Louis, Missouri, EUA), foram fornecidos pelo Professor Dr. Francisco Fabio Oliveira de Sousa do Laboratório de Controle de Qualidade, Bromatologia e Microbiologia da Universidade Federal do Amapá – UNIFAP.

3.1.1. Preparação do extrato da casca de romã

A coleta dos frutos de *Punica granatum* Linnaeus, foi realizada no Município de Almeirim / PA - Brasil (latitude: 1° 31' 43.8" S e longitude: 52° 34' 22.1" W) marcada por um medidor de posição global (GPS modelo *Garmin nuvi 40*). Foram coletados, além dos frutos utilizados para a preparação do extrato, ramos com folhas, ramo florido e uma amostra do fruto para a identificação botânica. A identificação do material vegetal foi depositada no Herbário Amapaense (HAMAB) do Instituto de Estudos e Pesquisas do Estado do Amapá (IEPA) sob o número de registro 18777, para fins de comprovação científica da planta.

Após a coleta, os frutos foram lavados com água corrente e sabão. Despulpou-se as cascas fragmentando-as em pedaços pequenos (1x1 cm), levando-as para secagem em estufa de ar circulante à temperatura de 40 °C por 72 horas. Posteriormente o material seco foi triturado em moinho de facas (Moinho Universal, modelo 060M007), onde obteve-se uma massa de 58 g do pó das cascas e submeteu-se a maceração por 7 dias em etanol (70%) (20% P/V) em temperatura ambiente (25 °C), realizando-se 2 trocas do solvente extrator, seguido de filtração. Em seguida a amostra foi submetida a um processo de evaporação deste solvente até a obtenção de solução hidroetanólico a 70%. O extrato foi acondicionado em um frasco âmbar e preservado a 4 °C até o início das análises.

3.2 AGENTE QUÍMICO INDUTOR DE DANOS NO DNA

O quimioterápico doxorrubicina (DXR) (Rubidox® Smartfarma Ltda., São Paulo, SP) foi utilizado como indutor de danos ao DNA em células de sangue periférico (controle positivo). O indutor foi dissolvido em água destilada e administrada intraperitonealmente (0,3 mL/animal). A concentração de DXR (15 mg/kg peso corpóreo, p.c.) foi estabelecida de acordo com a literatura (FRANKE et al., 2005; VENKATESH et al., 2007).

3.4 OBTENÇÃO E MANUTENÇÃO DOS ANIMAIS

Foram utilizados camundongos machos Swiss com 6 – 7 semanas de vida e aproximadamente 25 ± 5 g de peso corpóreo (p.c.) (Figura 10), provenientes do Biotério do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência de Animais de Laboratório (CEMIB) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). A pesquisa foi conduzida de acordo com os protocolos aceitos internacionalmente para o uso e cuidado de animais de laboratório. Os mesmos foram mantidos em caixas plásticas em uma sala experimental, sob condições controladas de temperatura (23 ± 2 °C), umidade ($50 \pm 10\%$), 12 horas de ciclo claro-escuro, com acesso *ad libitum* a ração e água. Os protocolos de tratamentos realizados neste trabalho foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UNIFAP (Protocolo 0016/2017) (Anexo 02).

Figura 10: Camundongos Swiss (macho) com 6 – 7 semanas



Fonte: Autor, 2018 (imagem própria).

3.5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

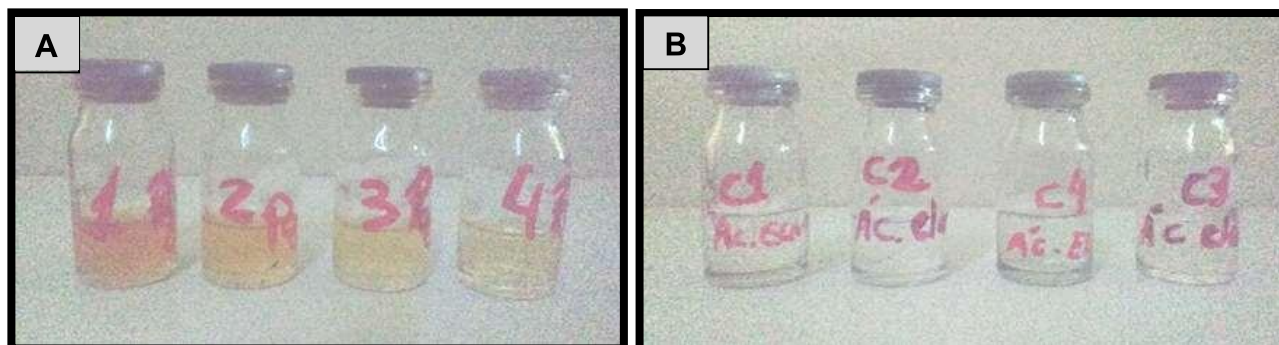
Os animais foram divididos aleatoriamente em vinte grupos (Tabela 03 e 04), contendo cinco camundongos em cada grupo de tratamento (Figura 11, A - B). As concentrações utilizadas do ECFPG (87,5; 175; 350 e 700 mg / kg / p.c., - Figura 12 - A) e do AE (1,4; 2,7; 5,3 e 10,5 mg / kg / p. c., - Figura 12 - B) foram determinadas a partir do Guia para a Condução de Estudos Não Clínicos de Toxicologia e Segurança Farmacológica Necessários ao Desenvolvimento de Medicamentos da ANVISA de 2013 e de trabalhos da literatura, administradas por gavagem (0,5 mL) durante 21 dias consecutivos, com intervalos de 24 horas, a administração da doxorubicina (15 mg / Kg p.c.) foi feita com uma injeção intraperitoneal (i.p.) e posteriormente foi feito a coleta das amostras.

Figura 11: Acondicionamento dos camundongos Swiss por grupo de tratamento - A e B



Fonte: Autor, 2018 (imagem própria).

Figura 12: Concentrações do extrato hidroetanólico da casca do fruto de *Punica granatum* Linnaeus - (A) e concentrações do ácido elágico - (B).



Fonte: Autor, 2018 (imagem própria).

Tabela 03 - Grupos experimentais e protocolos de tratamentos para teste do micronúcleo utilizando o extrato hidroetanólico da casca do fruto de *Punica granatum* Linnaeus (21 dias de tratamento).

Tratamento	Grupo ^a	Doses
Água (Controle Negativo)	1 ^a	-
ECFPG I	2 ^a	87,5 mg / kg
ECFPG II	3 ^a	175 mg / kg
ECFPG III	4 ^a	350 mg / kg
ECFPG IV	5 ^a	700 mg / kg
DXR (Controle Positivo)	6 ^a	15 mg / Kg p.c
ECFPG I + DXR	7 ^a	Como em (2) e (6)
ECFPG II + DXR	8 ^a	Como em (3) e (6)
ECFPG III + DXR	9 ^a	Como em (4) e (6)
ECFPG IV + DXR	10 ^a	Como em (5) e (6)

^a Cada grupo de tratamento apresenta 5 animais. ECFPG: extrato hidroetanólico da casca do fruto de *Punica granatum* Linnaeus; DXR: doxorubicina

Tabela 04 – Grupos experimentais e protocolos de tratamentos para teste do micronúcleo utilizando ácido elágico (21 dias de tratamento).

Tratamento	Grupo ^a	Doses
Água (Controle Negativo)	1 ^a	-
AE I	2 ^a	1,4 mg / Kg
AE II	3 ^a	2,7 mg / Kg
AE III	4 ^a	5,3 mg / Kg
AE IV	5 ^a	10,5 mg / kg
DXR (Controle Positivo)	6 ^a	15 mg / kg p.c.
AE I + DXR	7 ^a	Como em (2) e (6)
AE II + DXR	8 ^a	Como em (3) e (6)
AE III + DXR	9 ^a	Como em (4) e (6)
AE IV + DXR	10 ^a	Como em (5) e (6)

^a Cada grupo de tratamento apresenta 5 animais. AE, ácido elágico; DXR, doxorubicina

Os animais foram pesados diariamente antes da realização da gavagem, com o objetivo de avaliar possíveis alterações na massa corpórea decorrente do tratamento. Durante o período de tratamento, foram realizadas coletas da veia caudal (24 horas, 48

horas, 7 dias, 14 dias e 21 dias) para o teste do micronúcleo. Após o período de tratamento, foi realizado a coleta das amostras sanguíneas dos animais, sob efeito de anestésico, para a realização das análises hematológicas. Posteriormente, os camundongos foram eutanasiados através de câmara de gás (CO₂) com fluxo contínuo, para a coleta dos órgãos de interesse (fígado, baço, coração e rins), os mesmos foram pesados em balança de alta precisão e avaliados macroscopicamente. Em seguida, os órgãos foram armazenados em tubos coletores, devidamente identificados, contendo solução de formaldeído a 10% tamponado, mantendo assim, a conservação dos espécimes até a realização das análises histopatológicas feitas no Centro Universitário Unichristus.

3.6 PARÂMETROS AVALIADOS

3.6.1 Massa corpórea

A mensuração da massa corpórea dos animais foi realizada desde o primeiro dia do experimento, pesados diariamente para avaliar a variação do peso (ganho ou perda de massa corpórea).

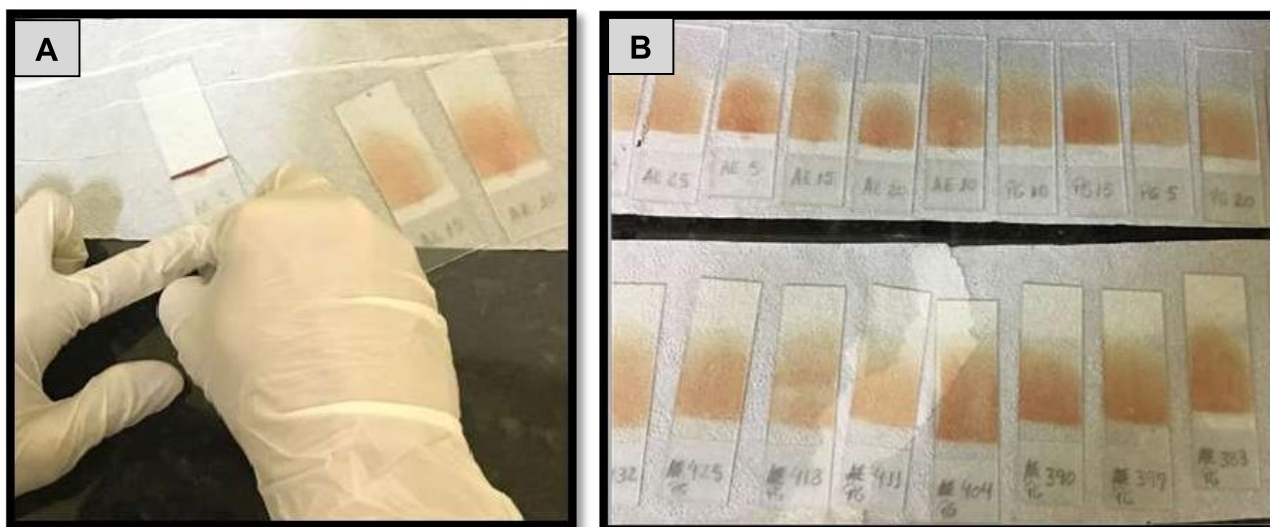
3.6.2 Teste do micronúcleo

Para obtenção de Eritrócitos Policromáticos Micronucleados (EPCMN) em amostras de sangue periférico de camundongos Swiss, foi realizado segundo o método descrito por MacGregor, Wehr e Gould (1980), com modificações. As amostras de sangue periférico de todos os grupos tratados foram coletadas da veia caudal após 24 horas, 48 horas, 7 dias, 14 dias e 21 dias de tratamentos (extrato hidroetanólico da casca da fruta de *Punica granatum* L. e do ácido elágico) para a observação do processo genotóxico.

Para a avaliação antígenotóxica, imediatamente após a administração do ECFPG e/ou do AE, no 20º dia de tratamento, os animais foram tratados com uma injeção intraperitoneal (i.p.) de DXR (0,3 mL / 25 g / p.c.) e posteriormente foi feito a coleta das amostras nos seguintes períodos (24 e 48 horas).

Foram consideradas as seguintes etapas para a realização do teste de micronúcleo: A ponta das caudas dos animais foi cortada e uma gota de sangue foi gotejada e arrastada (esfregaços sanguíneos) sobre lâminas limpas, que foram deixadas à temperatura ambiente (Figura 13 - A e B).

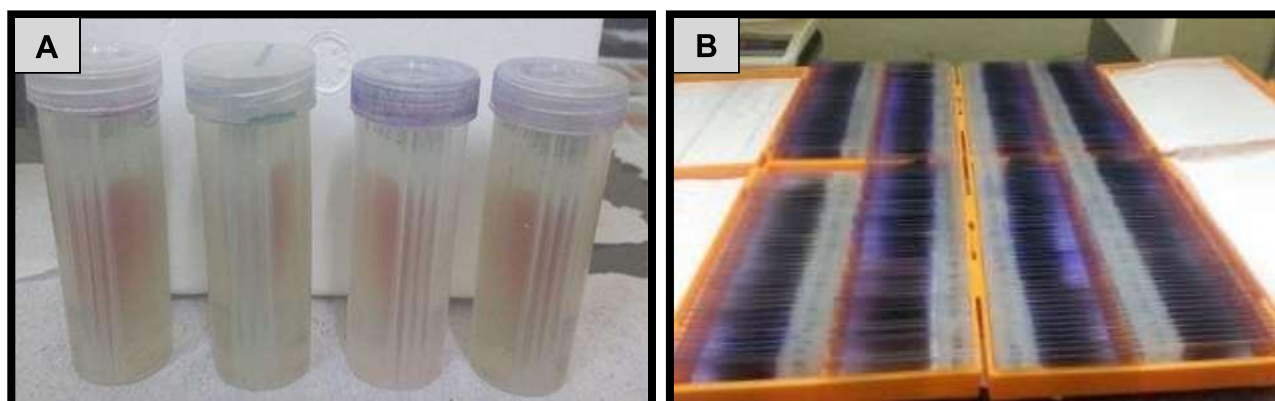
Figura 13: Esfregaço sanguíneo (A) e secagem das lâminas à temperatura ambiente (B)



Fonte: Autor, 2018 (imagem própria).

Imediatamente após a secagem, foram fixados em álcool metílico PA por 5 minutos (Figura 14 - A) e novamente secos à temperatura ambiente; Após 24 horas, as lâminas foram coradas com corante Giemsa diluído (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009) por 20 minutos; Em seguida, as lâminas foram lavadas para remover o excesso de corantes e secas à temperatura ambiente; Após secagem, foram armazenadas (Figura 14 – B) e lidas em microscópio óptico (Opton TIM-2008) na objetiva de imersão (100x).

Figura 14: Fixação das amostras com metanol - (A); Lâminas coradas com Giemsa prontas para análises - (B).



Fonte: Autor, 2018 (imagem própria).

3.6.2.1 Análise das lâminas

As lâminas de todos os animais (grupo tratados, controle negativo e positivo) foram codificadas e analisadas dentro de um curto espaço de tempo, por teste cego, de modo a eliminar erros de análise. A análise foi feita por mais de um observador, e seguiu um sistema balanceado, isto é, o número igual de células foi analisado em lâminas diferentes, em cada animal do estudo, por cada observador. O principal resultado do teste foi a frequência de eritrócitos policromáticos (EPC) que contém pelo menos um micronúcleo (frequência de EPCMN) (RIBEIRO et al., 2003).

As lâminas foram, primeiramente analisadas em aumento médio (20 a 40x), para encontrar campos de boa qualidade técnica, onde as células estavam bem espalhadas, não danificadas e coradas apropriadamente. Após a localização deste campo, o observador procedeu a análise das lâminas, usando um aumento de 100x (objetiva de imersão).

Para a determinação da frequência de EPCMN, 2000 EPCs por animal foram analisadas nas amostras de sangue periférico em 24 e 48 horas, 7, 14 e 21 dias, em microscópio de luz sob imersão (Figura 15). Um total de 400 eritrócitos por animal foi analisado para calcular o índice de divisão nuclear – IDN em cada amostra de sangue periférico a fim de determinar a citotoxicidade dos tratamentos (MERSCH-SUNDERMANN et al., 2004).

$$\text{IDN} = \frac{\text{EPC}}{\text{EPC} + \text{ENC}}$$

Figura 15: Eritrócitos Normocromáticos - ENC - (A); Eritrócitos Policromáticos – EPC - (B); Eritrócitos Policromáticos Micronucleados – EPCMN - (C).



Fonte: Autor, 2018 (imagem própria).

A porcentagem de redução na frequência de EPCMN foi calculada de acordo com Waters et al. (1990), como descrito a seguir:

$$\% \text{ Redução} = \frac{A - B}{A - C} \times 100$$

Onde A foi o grupo tratado com DXR (Controle Positivo), B o grupo tratado com ECFPG ou ácido elágico + DXR e o C foi o grupo tratado com água (Controle Negativo).

3.6.3 Parâmetros hematológicos

No 21º dia, foram coletadas amostras sanguíneas por meio do plexo orbital dos camundongos, os mesmos sob efeito anestésico, foram utilizados capilares internamente revertidos com ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), precavendo assim a coagulação da amostra até o tubo coletor, posteriormente, as análises hematológicas (série vermelha) fez-se a quantificação de hemácias, hemoglobina e hematócrito e na (série branca) fez-se a contagem total e diferencial dos leucócitos (%) (neutrófilos, linfócitos, monócitos e eusínófilos), as análises foram realizadas em contador automatizado BC-5300, Mindray.

3.6.4 Análise macroscópica, peso relativo e microscópico dos órgãos.

3.6.4.1 Análise macroscópica e peso relativo dos órgãos

Para a avaliação macroscópica dos órgãos, foram analisados sinais de lesões, tamanho e mudanças de cor dos seguintes espécimes (fígado, baço, coração e rins). Os órgãos foram pesados para calcular a massa relativa (MR) individualmente, utilizando a seguinte equação:

$$MR = \frac{(\text{massa do órgão} \times 100)}{\text{massa do animal}}$$

3.6.4.2 Análise microscópica dos órgãos

Após serem pesados, os órgãos retirados dos animais no dia do sacrifício foram armazenados em solução de formol 10% dissolvido em tampão fosfatado (Figura 16). Posteriormente, os mesmos foram lavados em água corrente e armazenados em álcool 70%. Em seguida, as peças foram seccionadas, colocadas em cassetes e encaminhadas para processamento histotécnico automatizado. Cortes de 4 µm de espessura foram feitos para confecção de lâminas coradas por Hematoxilina - Eosina e montadas em bálsamo de Canadá (JUNQUEIRA, JUNQUEIRA, 1983) para análise em microscópio de luz convencional quanto à presença de alterações específicas de cada órgão.

Figura 16: Armazenamento dos órgãos (fígado, baço, coração, rim direito e rim esquerdo) em solução de formol 10% dissolvido em tampão fosfatado.



Fonte: Autor, 2018 (imagem própria).

3.6.4.2.1 Fígado

As lâminas referentes ao tecido hepático foram avaliadas por meio de presença e/ou ausência, para cada uma das seguintes alterações consideradas (adaptado de VASCONCELOS et al., 2007; adaptado de BARBIERI et al., 2010):

- a) Infiltração de células inflamatórias;
- b) Tumefação celular e/ou vacuolização citoplasmática de hepatócitos;
- c) Hiperplasia de células de Kupffer;
- d) Degeneração balonizante dos hepatócitos;
- e) Congestão vascular portal e da veia centrolobular;
- f) Hemorragia sinusoidal;
- g) Fibrose;
- h) Necrose de hepatócitos;

- i) Esteatose microvesicular (>5%) em hepatócitos;
- j) Esteatose macrovesicular (>5%) em hepatócitos.

3.6.4.2.2 Baço

Para análise de toxicidade do baço, foram analisadas a presença e/ou ausência dos seguintes parâmetros:

- a) Foliculos bem formados e preservados;
- b) Congestão e hemorragia da polpa vermelha;
- c) Presença de pigmentos de hemossiderina;
- d) Hematopoiese extramedular;
- e) Atrofia esplênica
- f) Hiperplasia da polpa branca;
- g) Presença de fibrose.

3.6.4.2.3 Coração

Para análise de toxicidade do coração, foram analisadas a presença e/ou ausência dos seguintes parâmetros:

- a) Fibras longitudinais;
- b) Fibras transversais;
- c) Focos inflamatórios;
- d) Fenótipo do infiltrado inflamatório;
- e) Hemorragia;
- f) Pigmentos de hemossiderina e/ou lipofuscina.

3.6.4.2.4 Rins

Já para as lâminas referentes ao tecido renal, também foram utilizados os mesmos parâmetros de presença e/ou ausência, para cada uma das seguintes alterações consideradas (adaptado de VASCONCELOS et al., 2007; adaptado de BARBIERI et al., 2010):

- a) Preservação da estrutura glomerular;
- b) Tumefação do epitélio tubular;
- c) Congestão glomerular e intersticial;
- d) Vacuolização isomérica do epitélio tubular;
- e) Células inflamatórias intersticiais;
- f) Presença de cilindro-hialino;
- g) Presença de fibrose;
- h) Necrose nefrotóxica;
- i) Hemorragia tubular e intersticial.

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos nas diversas análises estão expressos por média $\pm$ desvio padrão da média de cada grupo experimental. Para comparar os dados dos grupos avaliados, aplicou-se a análise de variância (ANOVA), seguido do teste de Tukey, com significância de 5% ($p < 0.05$). Foram analisados pelo pacote estatístico GraphPad Prism® (versão 7).

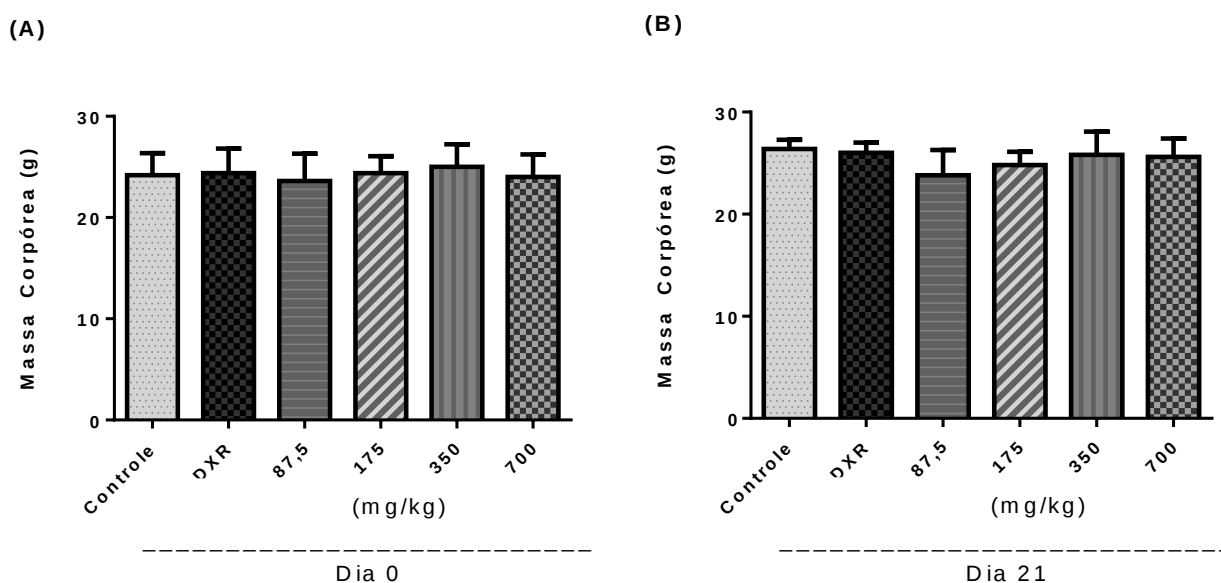
4.1. *Punica granatum* Linnaeus

4.1.1 Massa corpórea dos animais

Neste estudo, a mensuração da massa corpórea dos animais foram realizadas desde o primeiro dia do experimento, sendo pesados diariamente para avaliar a variação do peso (ganho ou perda de massa corpórea) ao longo dos 21 dias de tratamento com o ECFPG nas respectivas concentrações (87,5, 175, 350 e 700 mg / kg, p.c.).

A Figura 17, demonstra a massa corpórea média dos animais tratados com diferentes concentrações do ECFPG no início (A) e no fim (B) do experimento. Verificamos a ausência de alterações significativas na massa corporal dos animais submetidos à dose entre 87,5 e 700 mg / Kg, ($p > 0,05$). Em vista disso, o ECFPG não altera diretamente o peso corporal *in vivo* em doses tão altas quanto 700 mg / Kg administradas oralmente, endossando a segurança desta droga sob as condições experimentais utilizadas.

Figura 17: Massa corpórea média dos animais tratados com diferentes concentrações do extrato hidroetanólico da casca da fruta de *Punica granatum* Linnaeus durante 21 dias, sobre a Massa Inicial - (A) e Massa Final - (B). Os valores foram expressos como Média $\pm$ Desvio padrão. Não houve diferença estatística significativa entre os grupos avaliados em comparação com o grupo controle (ANOVA e Teste de Tukey). DXR: Doxorubicina.



Os resultados desta pesquisa, corroboram com o estudo realizado por Bassiri Jahromi et al. (2015), observaram a ausência de sinais e sintomas tóxicos (ganho de peso e parâmetros comportamentais) durante 22 dias de experimentos com doses repetidas (7,5 mg / kg por via oral) do extrato metanólico da casca de romã. Desta maneira, mesmo utilizando uma concentração de aproximadamente 93,33 vezes maior neste estudo pela mesma via de administração, comparado com o estudo de Bassiri Jahromi et al. (2015), não foi verificado mudanças significativas nestes parâmetros.

4.1.2 Teste de micronúcleo

4.1.2.1 Genotoxicidade e antigenotoxicidade de *Punica granatum* Linnaeus

O teste de micronúcleo é usado como um índice para avaliar a toxicidade genética em diferentes células após processamento (ZENG, et al., 2019), desta forma, o micronúcleo é considerado um biomarcador sensível, capaz de avaliar a exposição a diversas substâncias potencialmente genotóxicos (BEIRUTHY; KAZAN, 2016), além de possuir diversas vantagens em comparação a outros testes usados para diagnosticar doenças e monitorar contaminantes ambientais (MACGREGOR et al., 1987).

Segundo o protocolo estabelecido por Macgregor et al. (1987), as doses, as vias e o período de amostragem, são fatores relevantes na avaliação da genotoxicidade, neste contexto, as doses e o período de amostragem utilizadas neste estudo (87,5, 175, 350 e 700 mg/kg p.c.) foram elegidas de acordo com o protocolo de longa duração (estudos de administração múltipla) do *Guideline* da ANVISA (2013) para estudo da genotoxicidade, na qual é selecionado três níveis de doses, sendo que a dose máxima tolerada é de 1000 mg / kg para estudos de 14 dias ou mais.

Seguindo este protocolo, a administração do ECFPG nos grupos de tratamentos, além do controle negativo, foram realizadas por via oral, com o objetivo mimetizar a rota de administração com a forma popular do uso da romã, valorizando assim a via utilizada pela população. A partir do ensaio de genotoxicidade, não foi observada diferença significativa ($p > 0,05$) na frequência de micronúcleos em eritrócitos policromáticos entre o ECFPG e o grupo controle negativo (Tabela 05), demonstrando ausência total de genotoxicidade.

Tabela 05: Média e desvio padrão das frequências de eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCMNs) em sangue periférico de camundongos Swiss (24 horas, 48 horas, 7 dias, 14 dias e 21 dias) de animais tratados com diferentes concentrações do extrato hidroetanólico de *Punica granatum* Linnaeus e seus respectivos controles.

TRATAMENTO (mg/kg p. c.)	EPCMNs média $\pm$ DP				
	24 Horas	48 Horas	7 Dias	14 Dias	21 Dias
Controle	3,6 $\pm$ 0,54	3,8 $\pm$ 0,83	3,4 $\pm$ 1,14	3,6 $\pm$ 0,54	3,6 $\pm$ 0,89
87,5	4,0 $\pm$ 1,22	3,4 $\pm$ 1,14	3,4 $\pm$ 0,54	3,2 $\pm$ 1,30	4,0 $\pm$ 0,70
175	4,2 $\pm$ 1,30	3,2 $\pm$ 0,44	4,0 $\pm$ 1,0	3,6 $\pm$ 0,89	4,4 $\pm$ 0,54
350	3,8 $\pm$ 0,83	4,4 $\pm$ 0,54	3,0 $\pm$ 0,70	4,0 $\pm$ 0,70	4,4 $\pm$ 1,34
700	5,4 $\pm$ 0,89	4,4 $\pm$ 1,67	3,6 $\pm$ 0,89	4,4 $\pm$ 1,34	4,4 $\pm$ 0,89

Os valores foram expressos como Média $\pm$ Desvio padrão (n=5/grupo). Não houve diferença estatística significativa entre os grupos com *Punica granatum* Linnaeus em comparação com o grupo controle (p>0,05) (ANOVA e Teste de Tukey). EPCMNs: frequências de eritrócitos policromáticos micronucleados; DP: Desvio padrão.

As avaliações da genotoxicidade do extrato de romã já foram descritas em outros trabalhos. De Amorim, Borba e Armada, (1995) um dos primeiros estudos sobre os efeitos genotóxicos de romã, o mesmo não observou efeito genotóxico usando o teste de micronúcleo em camundongos tratados oralmente com extratos aquosos de romã (1000 e 2000 mg / kg p.c.). Outro estudo realizado por Vidal, et al. (2003), evidenciaram que a dose letal 50 - DL50 de romã foi de 731 mg / kg, *in vivo* após o uso intraperitoneal.

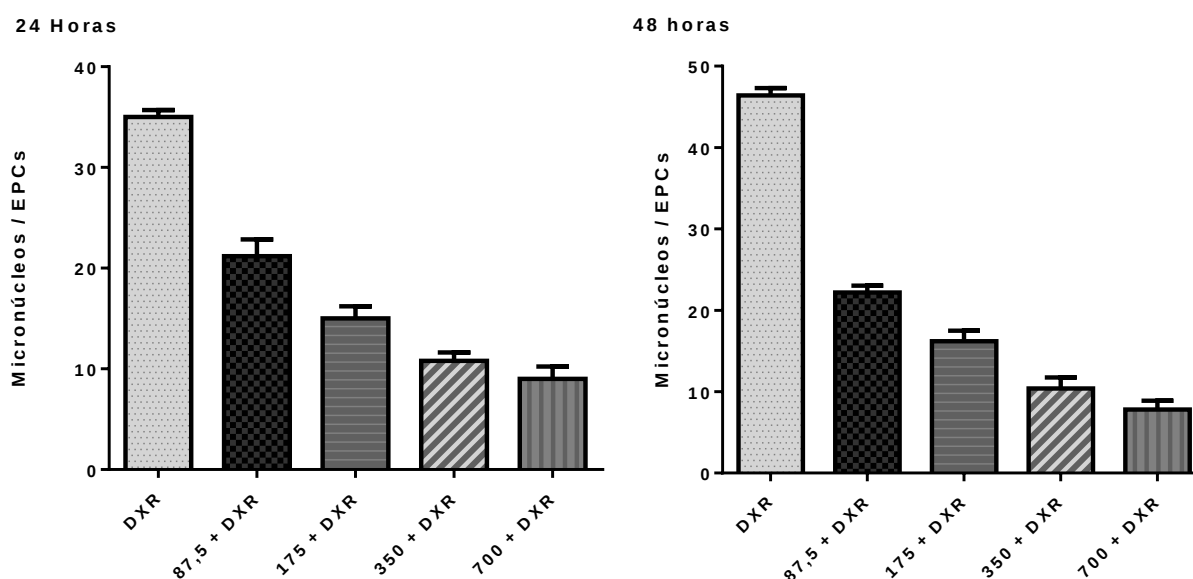
Estes resultados corroboram com os achados neste estudo, não evidenciado qualquer aumento significativo na frequência de micronúcleos em eritrócitos policromáticos utilizando o teste de micronúcleo. Neste contexto, podemos pressupor que diferentes fatores podem determinar estes efeitos, que vai desde as condições ambientais que a planta se encontra, as partes utilizadas, o modo de preparo e a via de administração. Além disso, diferentes metabólitos secundários estão presentes nas plantas, podendo variar de forma qualitativa e quantitativa. Sendo assim, este estudo indica que a casca de romã, nas doses de até 700 mg / kg p.c., não produz nenhum efeito sobre o material genético.

A DXR é considerado uma valiosa droga anticâncer eficaz para o tratamento de uma ampla gama de cânceres, porém, seu uso pode causar toxicidade em múltiplos órgãos. Embora vários mecanismos tenham sido sugeridos, tais como, a intercalação em DNA nuclear e mitocondrial e a inibição da enzima topoisomerase II, o papel do estresse oxidativo continua sendo o mecanismo mais provável para o efeitos adversos da doxorubicina, provocando danos no material genético e na estrutura celular, podendo levar a morte da mesma (PUGAZHENDHI, et al., 2018; RENU, et al., 2018).

Neste estudo, a DXR foi utilizada para induzir danos no material genético em células de sangue periférico de camundongos Swiss pela via intraperitoneal, uma vez que já está comprovado que esta via provoca danos no DNA (CARNEIRO, et al., 2017). Como esperado, o grupo tratado com DXR induziu a uma elevação significativa na frequência de micronúcleos em eritrócitos policromáticas em relação ao controle negativo, demonstrando um potencial efeito genotóxico na concentração de 15 mg / kg, p. c. (Figura 18), resultado que corroboram com diferentes estudos que identificaram a indução de danos no DNA provocados pela DXR em células de sangue periférico de camundongos Swiss nesta concentração (MONTEIRO NETO, et al., 2011; ALVES, et al., 2013).

Além disso, quando o ECFPG foi associado com DXR, reduziu significativamente a frequência de micronúcleos, demonstrando um potente efeito antigenotóxico dose-dependente do extrato, com taxas de redução de 43,9; 63,6; 77,07 e 82,8% em 24 horas e 56,8; 70,89; 84,5 e 90,6% em 48 horas para as dosagens de 87,5, 175, 350 e 700 mg / Kg respectivamente (Figura 18), quando comparado ao controle positivo (DXR). A maior concentração de 700 mg / Kg foi capaz de reduzir o efeito genotóxico da DXR no mesmo nível do grupo não tratado após 48 horas.

Figura 18: Frequências de eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCMNs) tratados com diferentes concentrações do extrato hidroetanólico da casca da fruta de romã + DXR (24 e 48 horas) e seus respectivos controles. Os valores foram expressos como Média $\pm$ Desvio padrão. Houve diferenças estatísticas significativas entre os grupos tratados com o grupo DXR em comparação aos grupos de tratamento (ANOVA e Teste de Tukey). EPCs: Eritrócitos Policromáticos; DXR: Doxorubicina.



Diversos estudos relatam o efeito antimutagênico da romã, Valadares et al. (2010), observaram uma diminuição significativa na frequência de eritrócitos policromáticos

micronucleados induzida pela ciclofosfamida em camundongos tratados por via oral com diferentes concentrações (12,5; 25; 50 ou 75 mg / kg) de extrato etanólico de folha e fruto de *Punica granatum* Linnaeus durante 10 dias consecutivos. Outro estudo relatou o efeito antigenotóxico do extrato de folhas de *Punica granatum* Linnaeus (400, 600 e 800 mg / kg de peso corporal, administrado por via oral por 7 dias) contra danos no DNA induzidos pela ciclofosfamida (DASSPRAKASH, et al., 2012). Em nosso estudo, os efeitos antigenotóxicos dependentes da dose de ECFPG resultaram em taxas de redução de micronúcleos de até 90,6% (dose de 700 mg / Kg) após 48 horas. Neste caso, o dano no material genético causado por DXR foi minimizado para os mesmos níveis que os animais tratados apenas com ECFPG.

Estes estudos demonstram o efeito protetor de diferentes partes da romã contra diferentes xenobióticos que provocam danos diretos ou indiretos no material genético, incluindo o efeito protetor do extrato hidroetanólico da casca do fruto de *Punica granatum* Linnaeus frente aos danos no material genético provocados pela DXR.

A presença de diferentes metabólitos secundários (quimiopreventivos) no extrato da casca da fruta de romã (SILVA, 2017), desempenham diversos efeitos, entre eles, a atividade antioxidante (ELFALLEH, et al., 2009), responsáveis pela diminuição do estresse oxidativo, minimizando assim, danos severos nas proteínas, lipídios e no próprio material genético (WANG; ZHAO, 2019), com base nisto, os efeitos antioxidantes provocados por esses fitoquímicos, ocasionam a proteção contra os danos ocasionados no DNA por diversas substâncias.

Deste modo, o uso de produtos naturais com características antimutagênicas, como foi o caso da *Punica granatum* Linnaeus utilizado neste estudo, que apresentou um efeito dose dependente, possibilita um avanço na descoberta dos verdadeiros efeitos desta planta, além de poder proporcionar uma alternativa na prevenção aos danos ao DNA provocados por diversas substâncias, evitando assim o surgimento de um câncer.

4.1.2.2 Índice de divisão nuclear – citotoxicidade de *Punica granatum* Linnaeus

Os eritrócitos são considerados um excelente modelo de avaliação de citotoxicidade de diferentes substâncias de origens naturais ou sintéticas por meios de medida de danos celulares, pois apresentam algumas características de vulnerabilidade à peroxidação, esses critérios faz com que as hemácias se torne um bom modelo de membrana biológica para avaliar o estresse oxidativo e a peroxidação lipídica de várias substâncias, analisando

assim os danos decorridos desses xenobióticos (FARAG; ALAGAWANY, 2018).

Com base nisto, não identificamos nenhuma alteração significativa entre os grupos tratados com diferentes concentrações do ECFPG comparando com o grupo controle e o grupo DXR, além dos grupos ECFPG + DXR, ($p>0,05$) indicando que o extrato hidroetanólico da casca da fruta de *Punica granatum* Linnaeus nestas doses não foram citotóxico em diferentes dias (24 horas, 48 horas, 7 dias, 14 dias e 21 dias) após os tratamentos, como demonstrado na Tabela 06.

Tabela 06: Índice de divisão nuclear (IDN) em sangue periférico de animais submetidos a diferentes concentrações do extrato hidroetanólico da casca do fruto de *Punica granatum* Linnaeus e/ou DXR e seus respectivos controles, (24 horas, 48 horas, 7 dias, 14 dias e 21 dias) após tratamentos.

Tratamento (mg / kg p. c.)	IDN Média $\pm$ DP				
	24 Horas	48 Horas	7 Dias	14 Dias	21 Dias
Controle	0,03 $\pm$ 0,004	0,03 $\pm$ 0,02	0,03 $\pm$ 0,004	0,03 $\pm$ 0,007	0,03 $\pm$ 0,01
87,5	0,02 $\pm$ 0,006	0,02 $\pm$ 0,004	0,02 $\pm$ 0,005	0,02 $\pm$ 0,004	0,02 $\pm$ 0,004
175	0,02 $\pm$ 0,007	0,02 $\pm$ 0,008	0,02 $\pm$ 0,004	0,02 $\pm$ 0,003	0,02 $\pm$ 0,003
350	0,02 $\pm$ 0,009	0,02 $\pm$ 0,008	0,02 $\pm$ 0,002	0,02 $\pm$ 0,008	0,02 $\pm$ 0,006
700	0,02 $\pm$ 0,005	0,02 $\pm$ 0,01	0,03 $\pm$ 0,008	0,04 $\pm$ 0,006	0,02 $\pm$ 0,01
DXR	0,02 $\pm$ 0,002	0,02 $\pm$ 0,002	-	-	-
87,5 + DXR	0,03 $\pm$ 0,006	0,02 $\pm$ 0,005	-	-	-
175 + DXR	0,03 $\pm$ 0,003	0,02 $\pm$ 0,005	-	-	-
350 + DXR	0,03 $\pm$ 0,003	0,03 $\pm$ 0,004	-	-	-
700 + DXR	0,02 $\pm$ 0,0008	0,02 $\pm$ 0,005	-	-	-

Valores das médias $\pm$ desvio padrão. 400 eritrócitos foram analisados por animal, sendo um total de 2000 células por grupo de tratamento; Não houve diferenças estatísticas significativas entre os grupos tratados em comparação ao grupo controle. DP: Desvio padrão; IDN: Índice de divisão nuclear; DXR: Doxorubicina.

Um estudo realizado por Valadares et al. (2010), utilizando o extrato da folha e da fruta de PG por 10 dias (v.o.), não evidenciou nenhum efeito citotóxico nas células da medula óssea de camundongos, ou seja, não houve diferença estatisticamente significativa na relação entre EPC e ENC entre o controle negativo e os grupos tratados. Outro estudo avaliando os extratos de frutas (aquoso e etanólico) de *Punica granatum* Linnaeus (100, 150, 200 ou 300 μ g / ml) observaram um efeito protetor nos hepatócitos contra todos os marcadores de citotoxicidade (ZARGAR; POURAHMAD, 2014).

Desta forma, podemos pressupor que os extratos de *Punica granatum* Linnaeus, preparados por diferentes meios, não são considerados citotóxicos para diferentes tipos celulares, incluindo para os eritrócitos, onde não identificamos a presença de citotoxicidade neste estudo, avaliada pela relação entre EPC e ENC, proporcionando um avanço nas

buscas dos possíveis efeitos tóxicos da romã.

4.1.3 Parâmetros hematológicos

Não foram observadas alterações significativas no eritrograma (RBC, HGB, HCT) ($p > 0,05$) e parâmetros hematológicos - Leucograma (Leucócitos Totais ($10^3 / \mu\text{L}$), Neutrófilos (%), Linfócitos (%) e Monócitos (%)) como demonstra a Tabela 07. Entretanto, o grupo tratado com ECFPG na concentração intermediária de 350 mg / kg pc apresentou um incremento atípico na contagem diferencial de eosinófilos ($p < 0,01$) quando comparado ao grupo controle negativo.

Tabela 07. Efeito do Extrato hidroetanólico da casca da fruta *Punica granatum* Linnaeus sobre os parâmetros eritrocitários e leucograma de camundongos Swiss.

Parâmetros	Grupos				
	Controle	87,5 mg/kg/dia	175 mg/kg/dia	350 mg/kg/dia	700 mg/kg/dia
RBC ($10^6/\mu\text{L}$)	7,91 $\pm$ 3,23	5,99 $\pm$ 1,38	6,34 $\pm$ 3,06	9,12 $\pm$ 1,11	9,20 $\pm$ 0,37
HGB (g/dL)	12,2 $\pm$ 3,39	10,25 $\pm$ 1,90	10,8 $\pm$ 3,81	12,8 $\pm$ 0,42	14,25 $\pm$ 0,63
HCT (%)	42,5 $\pm$ 1,53	41,9 $\pm$ 1,48	40,8 $\pm$ 1,54	43,2 $\pm$ 1,23	42,05 $\pm$ 0,63
Leucócitos totais ($10^3/\mu\text{L}$)	7,41 $\pm$ 0,36	8,86 $\pm$ 0,89	6,41 $\pm$ 0,26	8,33 $\pm$ 0,49	8,25 $\pm$ 0,18
Neutrófilos (%)	18,95 $\pm$ 1,17	26,25 $\pm$ 1,90	24,4 $\pm$ 4,10	26,05 $\pm$ 3,32	20,9 $\pm$ 3,25
Linfócitos (%)	73,5 $\pm$ 1,52	68,4 $\pm$ 1,83	68,05 $\pm$ 0,35	68,75 $\pm$ 1,34	77,7 $\pm$ 4,10
Monócitos (%)	1,7 $\pm$ 0,42	1,1 $\pm$ 0,42	1,6 $\pm$ 0,21	1,5 $\pm$ 0,42	1,2 $\pm$ 0,70
Eosinófilos (%)	1,7 $\pm$ 0,56	1,8 $\pm$ 0,14	1,7 $\pm$ 0,28	8,1 $\pm$ 0,28 **	1,5 $\pm$ 1,27

Os valores foram expressos como média $\pm$ Desvio padrão ($n=5$). Houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos avaliados comparando com o grupo controle ** ($p < 0,01$) (ANOVA e Teste de Tukey). RBC (Eritrócitos totais), HGB (Hemoglobina), HCT (Hematócrito).

Por outro lado, os resultados obtidos neste estudo também demonstram que a administração do extrato hidroetanólico da casca da fruta *Punica granatum* Linnaeus não provocou alterações significativas na contagem de leucócitos totais, indicando ausência de efeitos imunossupressivos direto nos leucócitos do sangue periférico. Além disso, houve a presença de eosinofilia ocasional na dose de 350 mg / kg p.c. Porém, como os valores relativos destes eosinófilos na maior concentração (700 mg/kg, p.c.) ainda se enquadraram dentro da faixa de normalidade, este resultado aleatório não está diretamente relacionado ao ECFPG, entretanto, essa sugestão deve ser encarada com parcimônia, possibilitando assim, mais estudos para que se possa investigar adequadamente a natureza desses

resultados.

Estes resultados corroboram com outros estudos na literatura, na qual não foi observado alterações significativas nos parâmetros hematológicos *in vivo*. Um estudo realizado por Patel, et al. (2008), não foi encontrada nenhuma alteração nos exames clínicos e hematológicos em ratos machos e fêmeas tratados oralmente com extrato etanólico do pericarpo da *P. granatum* em doses de até 600 mg / kg por 90 dias. Portanto, nossos resultados corroboram com outros estudos, nos quais não foram encontradas alterações significativas nos parâmetros hematológicos *in vivo*.

4.1.4 Análise macroscópica, microscópica e peso relativo dos órgãos

Em vista dos parâmetros dos órgãos vitais, cor, textura, tamanho e forma, não foram observadas alterações macroscópicas. Da mesma forma, não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$) na massa de órgãos nos animais tratados com as diferentes concentrações do ECFPG. Por outro lado, o grupo tratado com DXR apresentou um aumento significativo do peso médio do fígado ($p < 0,01$) em relação ao grupo controle (Tabela 08).

Tabela 08. Efeito do extrato hidroetanólico da casca da fruta de *Punica granatum* Linnaeus sobre a massa média dos órgãos dos animais tratados durante 21 dias com diferentes concentrações.

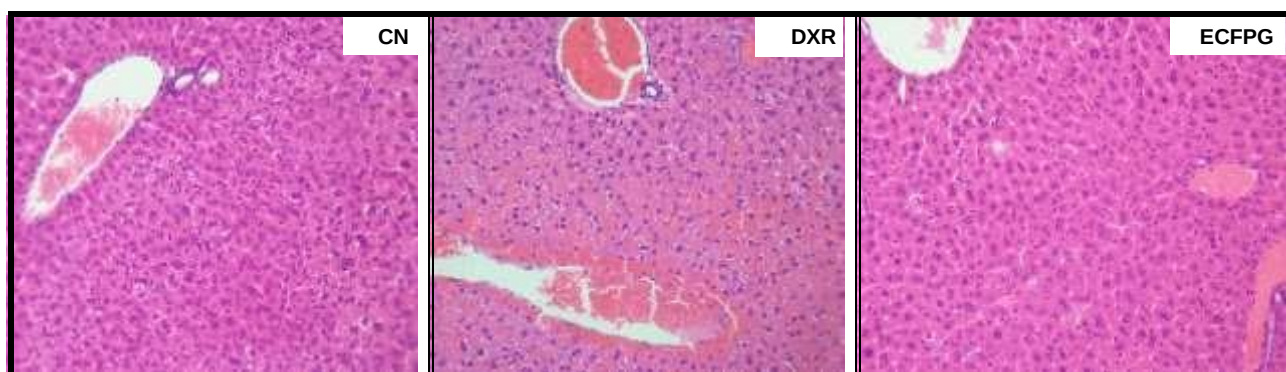
Tratamento	Dose (mg/kg/dia)	Órgãos (g/100g de massa corpóreo)				
		Fígado	Baço	Coração	Rim Direito	Rim Esquerdo
Controle	-	3,64 ± 0,42	0,23 ± 0,0004	0,50 ± 0,04	0,82 ± 0,13	0,73 ± 0,07
DXR	15	6,53 ± 0,10 **	0,18 ± 0,01	0,53 ± 0,004	0,63 ± 0,17	0,70 ± 0,06
	87,5	4,46 ± 0,47	0,43 ± 0,33	0,54 ± 0,04	0,71 ± 0,15	0,68 ± 0,11
<i>Punica granatum</i>	175	3,50 ± 0,07	0,20 ± 0,001	0,48 ± 0,06	0,62 ± 0,04	0,70 ± 0,06
	350	4,61 ± 0,65	0,26 ± 0,03	0,52 ± 0,09	0,65 ± 0,11	1,10 ± 0,35
	700	4,58 ± 0,006	0,21 ± 0,002	0,50 ± 0,06	0,64 ± 0,08	0,68 ± 0,16

Os valores foram expressos como média ± desvio padrão. Diferenças significativas entre os valores foram expressas como ** ($p < 0,01$) em comparação com o grupo tratado com o controle (negativo) (ANOVA e Teste de Tukey). DXR: Doxorubicina.

Tendo em vista que não houve variação importante entre os subgrupos, operou-se por descrevermos os resultados em conjuntos. Algumas alterações morfológicas ocasionais foram observadas microscopicamente (Figura 19, 20, 21 e 22); ambos nos animais tratados e não tratados com ECFPG. Em contraste, algumas alterações distintas

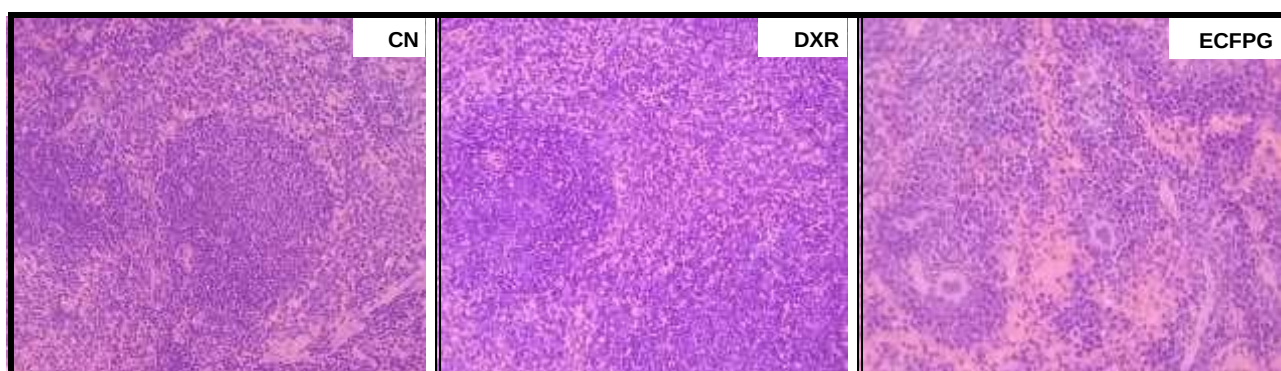
nos animais tratados com ECFPG foram evidenciadas: no baço houve alguma congestão na polpa vermelha, um dos espécimes com megacariócitos, sugerindo uma atividade imunomoduladora (BANKS W. J., 1992), discreto foco hemorrágico no coração e ocasionais áreas contendo hemorragia tubular e intersticial próximas a vasos congestivos no rim. Nesse contexto, o tratamento com ECFPG não induziu lesões graves nos órgãos quando comparado ao grupo controle, enquanto essas alterações podem ser resultado de baixa toxicidade relacionada ao uso prolongado de ECFPG.

Figura 19: Análise histopatológica do fígado.



Legenda: Análise histopatológica do fígado, observou-se no **grupo CN**: Cordões de hepatócitos com discreta tumefação celular, congestão portal e da veia terminal, além de leve degeneração hidrópica. Hiperplasia das células de Kupffer podia ser observada em todos os animais, porém não houve indícios de hemorragia sinusoidal ou focos de células inflamatórias. **Grupo DXR**: Cordões de hepatócitos com moderada tumefação celular, focos de degeneração hidrópica e intensas congestão portal e da veia termina e hiperplasia das células de Kupffer. Hemorragia sinusoidal e áreas de edema foram verificadas em duas amostras, porém, não se observaram focos de células inflamatórias. **No grupo tratado com ECFPG**: observou-se cordões de hepatócitos com leves tumefação celular e degeneração hidrópica, congestão portal e da veia terminal, além de moderada hiperplasia das células de Kupffer. Não houve indícios de hemorragia sinusoidal ou focos de células inflamatórias.

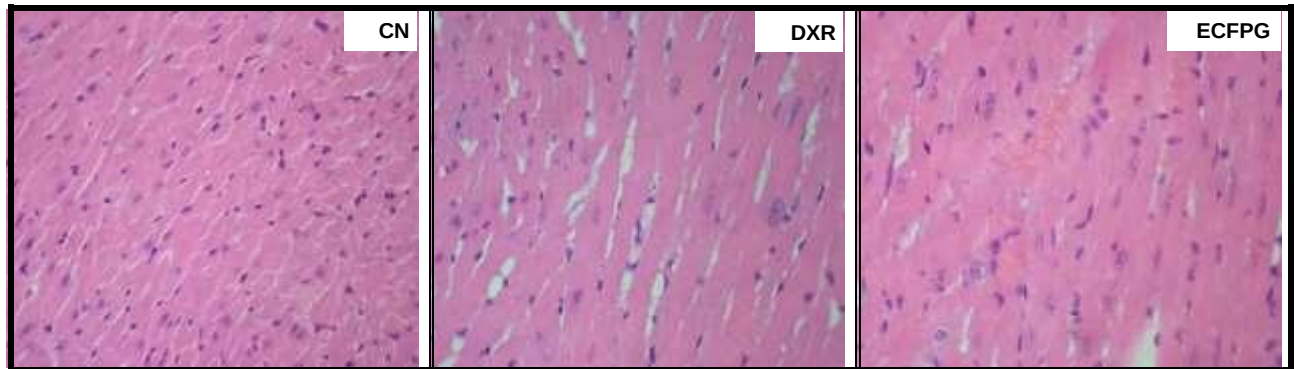
Figura 20: Análise histopatológica do baço.



Legenda: Análise histopatológica do baço, observou-se no **grupo CN**: Polpa branca constituída por bainha de linfócitos (T) periarteriais situadas excentricamente em relação às artérias centrais e nódulos esplênicos (corpúsculos de Malpighi) com centro germinativo, este último, em sua maioria. Em continuidade, há polpa vermelha composta por eritrócitos, seios esplênicos e trabéculas esplênicas. **Grupo DXR**: Polpa branca constituída por bainha de linfócitos (T) periarteriais situadas

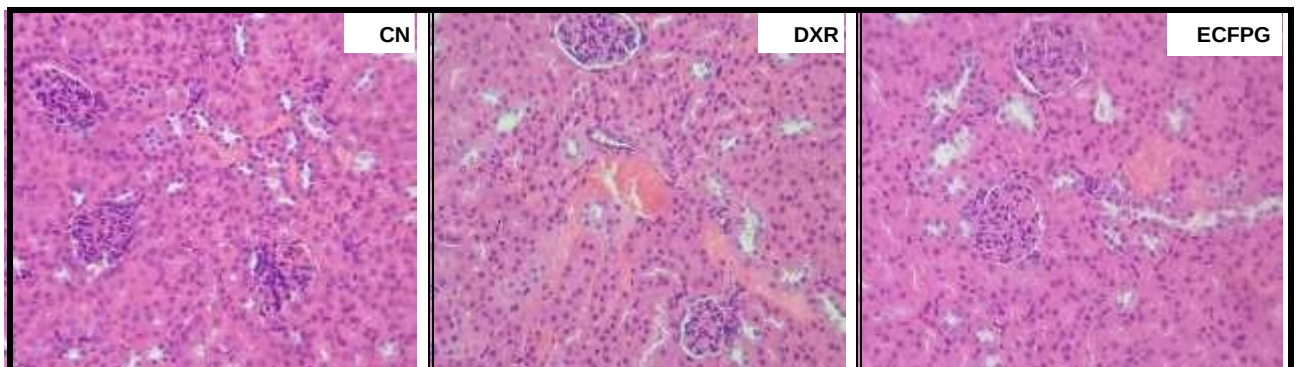
excentricamente em relação às artérias centrais e nódulos esplênicos com centro germinativo, este último, em sua maioria. Em uma das amostras, a polpa branca se encontrava hiperplásica. Há polpa vermelha composta por eritrócitos, seios esplênicos e trabéculas esplênicas. **No grupo tratado com ECFPG:** observou-se polpa branca hiperplásica e desorganizada. Em continuidade, há polpa vermelha composta por eritrócitos, seios esplênicos e trabéculas esplênicas. Em duas amostras viu-se congestão da polpa vermelha, uma das quais com inúmeros megacariócitos de permeio.

Figura 21: Análise histopatológica do coração.



Legenda: Análise histopatológica do coração (síntese dos três grupos): observou-se nas amostras, tecido muscular estriado cardíaco, apresentando preservação de fibras longitudinais e transversais, e ausência de pigmentos de hemossiderina ou lipofuscina. A presença de focos de discreta hemorragia foi visualizada. Raramente, o quadro histológico foi acompanhado da presença de focos de adipócitos típicos adjacentes ao tecido muscular.

Figura 22: Análise histopatológica dos rins



Legenda: Análise histopatológica dos rins, observou-se no **Grupo CN:** Amostras representadas por córtex e medula renais com distribuição normal das estruturas glomerulares e tubulares, com ausência de necrose, glomerulopatias e glomerulonefrites. Não foram observados tumefação moderada do epitélio tubular com áreas focais de degeneração vacuolar, porém cilindro-hialinos puderam ser vistos em metade da amostra. **Grupo DXR:** Amostras representadas por córtex e medula renais com distribuição normal das estruturas glomerulares e tubulares, com ausência de necrose, glomerulopatias e glomerulonefrites. Não foram observados tumefação moderada do epitélio tubular, porém notáveis cilindro-hialinos e áreas de Hemorragia tubular e intersticial foram observados na maioria dos casos. **No grupo tratado com ECFPG:** observou-se córtex e medula renais com distribuição normal das estruturas glomerulares e tubulares, com ausência de necrose, glomerulopatias e glomerulonefrites. Foram observados cilindro - hialinos e ocasionais áreas contendo hemorragia tubular e intersticial próximas a vasos congestos.

Um requisito importante em experimentos toxicológicos é a capacidade de mensurar os efeitos de substâncias em órgãos específicos, essa avaliação é feita através de exame macroscópico, mensuração do peso dos órgãos e exame histopatológico do tecido. Além disso, o peso do órgão pode ser o indicador mais sensível do efeito de um composto experimental (OLIVEIRA, et al., 2016). Sendo assim, não foram observados alterações significativos na massa corpórea dos órgãos tratados com ECFPG neste estudo.

Lesões microscópicas esporádicas foram observadas nos órgãos, tanto nos grupos de controle tratados como nos não tratados. Nesse contexto, o tratamento com ECFPG não induziu lesões graves nos órgãos, enquanto as alterações observadas são decorrentes da baixa toxicidade relacionada ao uso em longo prazo do extrato hidroetanólico de romã.

Vários estudos relatam que o extrato de romã proporciona a elevação do sistema de defesa antioxidante, o que pode resultar em atividade antioxidante de até 92%, reduzindo os radicais livres e diminuindo os danos oxidativos em diferentes órgãos contra a toxicidade (ELFALLEH, et al., 2009; ISMAIL; SESTILI; AKHTAR, 2012; MONEIM; EL-KHADRAGY, 2013; WANG, E ZHAO, 2019). Isso pode explicar nossos achados, uma vez que não foram observadas alterações significativas na massa dos órgãos ou apreciação histopatológica, resultando em sinais de pouca ou nenhuma toxicidade em comparação com o grupo controle.

A presença de diferentes metabólitos secundários (quimiopreventivos) no extrato da casca da fruta de romã (CAYIR et al., 2011; ZARGAR, & POURAHMAD, 2014; SILVA, 2017), desempenham diversos efeitos, entre eles, a atividade antioxidante (TAVARES, 2018), com base nisto, os efeitos antioxidantes provocados por esses fitoquímicos, ocasionam a proteção contra os danos ocasionados no DNA por diversas substâncias incluindo a DXR.

Em resumo, nossos achados mostraram que o ECFPG não é genotóxico, citotóxico e não altera parâmetros hematológicos. Além disso, apresentou um efeito antígenotóxico substancial e, como tal, poderia ser considerada uma importante alternativa fitoterápica na quimioprevenção de doenças relacionados danos oxidativos e ao DNA.

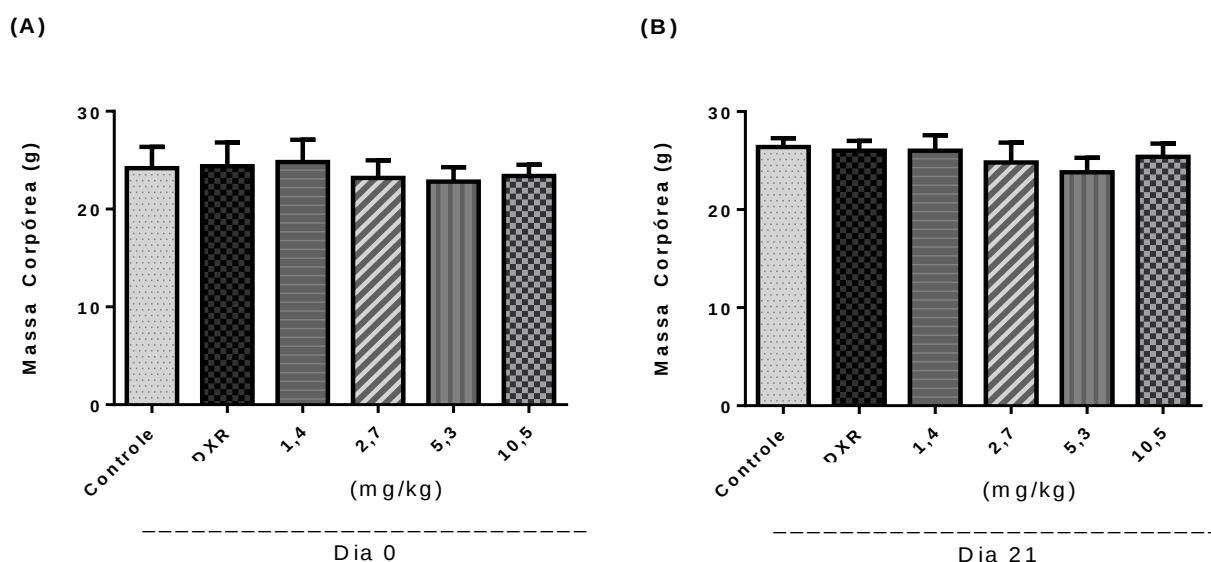
4.2 ÁCIDO ELÁGICO

4.2.1 Massa corpórea dos animais

A análise do peso corpóreo tem sido um dos critérios de suma importância empregada em estudos toxicológicos de diferentes substâncias, isto se dá pelo fato de que qualquer alteração nesse parâmetro pode ditar um possível efeito tóxico do composto testado (HERNANDES, et al., 2014). Neste sentido, a análise da massa corpórea neste estudo, foi realizada diariamente para verificar possíveis alterações de peso (ganho ou perda de massa corpórea) em camundongos tratados com diferentes concentrações de ácido elágico (1,4; 2,7; 5,3 e 10,5 mg / kg, p.c.).

A Figura 23 mostra a massa corpórea média dos animais tratados com diferentes concentrações do ácido elágico desde o início (A) até o fim (B) do experimento. Com base nas análises feitas, verificou-se que não houve mudanças significativas na massa corpórea (g) dos animais estudados ($p > 0,05$).

Figura 23: Massa corpórea média dos animais tratados com diferentes concentrações do ácido elágico, massa Inicial (A) e Massa Final (B). Os valores foram expressos como Média $\pm$ Desvio padrão. Não houve diferença estatística significativa entre os grupos avaliados em comparação com o grupo controle (ANOVA e Teste de Tukey). DXR: Doxorubicina.



De acordo com Teel e Castonguay (1992), o ácido elágico é absorvido rapidamente pelo sistema gastrointestinal (15 minutos) após a administração oral do mesmo. Desta forma, as concentrações do ácido elágico foram administradas em intervalos de 24 horas, garantindo uma absorção adequada neste estudo. Além disso, nossos resultados

corroboram com o estudo realizado por Berni et al. (2012), não evidenciando qualquer alteração na massa corpórea de ratos tratados com ácido elágico (50 e 100 mg/kg p.c., administrados por gavagem) durante cinco dias. Berni et al. (2012), não evidenciou qualquer alteração na massa corpórea de ratos tratados com ácido elágico (50 e 100 mg/kg p.c., administrados por gavagem) durante cinco dias.

Neste contexto, levando em consideração que a ingestão diária humana estimada de AE é de 940 µg / dia para uma pessoa de 70 kg ou 13,4 µg / kg de peso corporal / dia (ALLEN, et al., 2003). As doses usadas neste estudo devem ser consideradas mais na faixa de um agente quimioterápico e da composição em produtos naturais, neste sentido, podemos pressupor que a utilização desta substância, com base neste estudo, é considerada seguro para o uso, principalmente de alguns produtos naturais que possuem em sua constituição o AE, não alterando assim o peso corpóreo dos animais, como foi o caso da *Punica granatum* Linnaeus realizada neste estudo.

4.2.2 Teste de micronúcleo

4.2.2.1 Genotoxicidade e antigenotoxicidade do ácido elágico

Diferentes fatores contribuem para a avaliação da genotoxicidade e antigenotoxicidade, incluindo a dose, a via e o período de amostragem, desta forma, as doses utilizadas neste estudo foram elegidas com base em estudos da literatura (KILIC; YEŞILOĞLU; BAYRAK, 2014; VARSHNEY; VIJAYAN; MESHRAM, 2015; FIRDAUS, et al., 2018), sendo observados diversos efeitos biológicos nesta faixa de concentração.

Além disso, a administração do ácido elágico foi realizada por via oral, visto que essa substância está presente em diferentes produtos naturais, incluindo a romã (DALVI, 2014; GONZÁLEZ-SARRÍAS, et al., 2015; MORAES, 2017), sendo esta via, utilizadas rotineiramente pela população para o consumo desses produtos naturais, desta forma, tentamos valorizar a maneira que a sociedade utiliza estes produtos e seus metabólitos secundários. Entretanto, a DXR foi administrada pela via intraperitoneal, já que os efeitos de provocar danos no DNA por esta via já são comprovados.

A partir do ensaio de genotoxicidade, o tratamento com AE administrado por gavagem por 21 dias consecutivos, intervalos de 24 horas não mostrou diferença significativa ($p > 0,05$) na frequência de micronúcleos em relação ao controle negativo em diferentes períodos (24 horas, 48 horas, 7 dias, 14 dias e 21 dias), demonstrando ausência

de genotoxicidade (Tabela 09).

Tabela 09: Frequências de eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCMNs) com suas respectivas médias e desvio padrão em sangue periférico de camundongos Swiss (24 horas, 48 horas, 7 dias, 14 dias e 21 dias) de animais tratados com diferentes concentrações do ácido elágico e seus respectivos controles.

TRATAMENTO (mg / kg p. c.)	EPCMNs média $\pm$ DP				
	24 Horas	48 Horas	7 Dias	14 Dias	21 Dias
Controle	3,6 $\pm$ 0,54	3,8 $\pm$ 0,83	3,4 $\pm$ 1,14	3,6 $\pm$ 0,54	3,6 $\pm$ 0,89
1,4	3,2 $\pm$ 0,83	3,6 $\pm$ 0,54	3,4 $\pm$ 0,89	3,6 $\pm$ 0,54	3,8 $\pm$ 0,44
2,7	4,0 $\pm$ 1,0	4,4 $\pm$ 0,54	3,6 $\pm$ 0,54	3,8 $\pm$ 4,4	4,2 $\pm$ 0,44
5,3	3,2 $\pm$ 0,44	4,6 $\pm$ 0,54	3,4 $\pm$ 0,89	3,8 $\pm$ 1,09	4,4 $\pm$ 1,14
10,5	3,8 $\pm$ 0,83	5,0 $\pm$ 1,22	4,4 $\pm$ 1,14	4,2 $\pm$ 0,44	5,0 $\pm$ 0,70

Os valores foram expressos como Média $\pm$ Desvio padrão. Não houve diferença estatística significativa entre os grupos tratados com ácido elágico em comparação com o grupo controle ($p > 0,05$) (ANOVA e Teste de Tukey). EPCMNs: Frequências de eritrócitos policromáticos micronucleados; DP: Desvio Padrão.

Estes resultados corroboram com os estudos realizados por Grossi, et al. (2014), que verificaram que o AE (50 e 100 mg / kg p.c.) isoladamente não teve efeito sobre MNPCes, PCEs / NCEs e % PCEs, durante cinco dias de tratamento, em comparação com o controle. Neste estudo, o teste do micronúcleo não evidenciou aumento na frequência de micronúcleos em eritrócitos policromáticos, afirmando que o AE não possui efeito genotóxico nas condições empregadas.

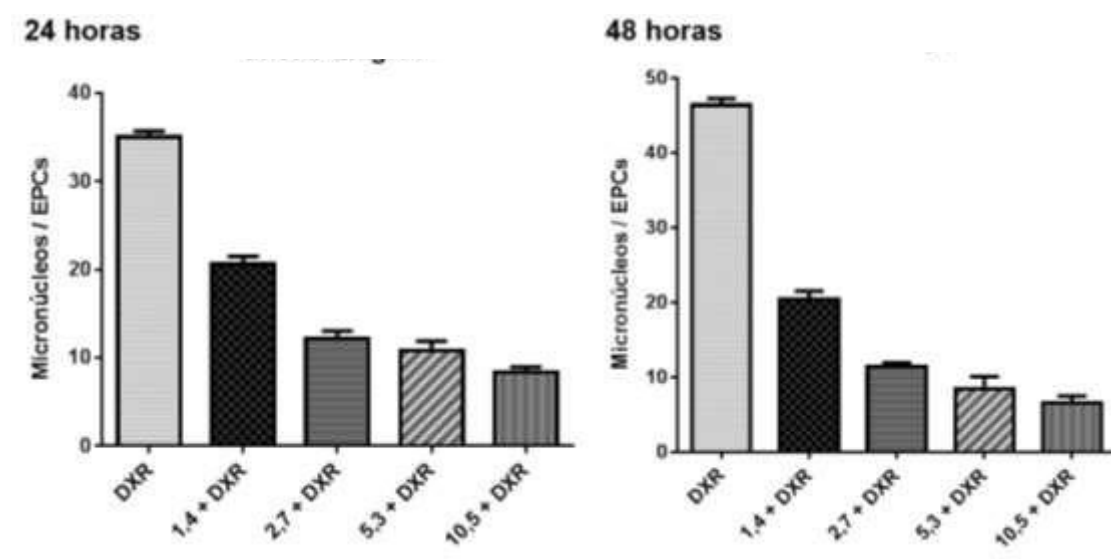
Diversos mecanismos são sugeridos para a ação da DXR, como a inibição da síntese de proteínas e replicação de DNA pela capacidade de intercalar-se ao DNA, porém, o estresse oxidativo é o principal mecanismo dessa substância, produzindo danos oxidativos no material genético (TOMASINI, 2018).

Desta forma, analisando o grupo tratado com DXR (Figura 24), observamos uma elevação significativa em diferentes períodos (24 e 48 horas) na frequência de micronúcleos em células policromáticas de sangue periférico em relação ao grupo controle negativo, demonstrando um potencial efeito genotóxico desta substância. Estes resultados corroboram com o estudo realizado por Carneiro, et al. (2017), que evidenciou danos no DNA provocados pela doxorrubicina em eritrócitos policromáticos de camundongos Swiss utilizando a concentração de 15 mg / kg p.c.

No entanto, quando o AE foi associado com DXR, reduziu significativamente a frequência de micronúcleos em eritrócitos policromáticos, demonstrando um efeito antígeno-tóxico potente dependente da dose do AE, com uma taxa de redução de 45,86;

72,6; 77,07 e 84,7% em 24 horas e 61; 82,1; 89,2 e 93,4% em 48 horas, respectivamente (Figura 24), quando comparado ao controle positivo (DXR). A maior concentração de 10,5 mg / Kg foi capaz de reduzir o efeito genotóxico da DXR no mesmo nível do grupo não tratado após 48 horas.

Figura 24: Frequências de eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCMN) tratados com diferentes concentrações do ácido elágico + DXR (24 e 48 horas) e seus respectivos controles. Os valores foram expressos como Média $\pm$ Desvio padrão. Houve diferenças estatísticas significativas entre os grupos tratados com o grupo DXR em comparação aos grupos de tratamento (ANOVA e Teste de Tukey). EPCs: Eritrócitos policromáticos; DXR: Doxorubicina.



Diversos estudos relatam os efeitos protetores do AE contra esses danos oxidativos no organismo, esses efeitos estão associados diretamente com a atividade antioxidante do mesmo. Sudheer, et al. (2007) verificaram um aumento na frequência de micronúcleos em linfócitos tratados com nicotina, porém, o mesmo estudo, demonstrou que o tratamento simultâneo com ácido elágico reduziu significativamente a frequência micronúcleo, desempenhando assim um efeito protetor contra a toxicidade da nicotina.

No estudo realizado por Varshney; Vijayan; Meshram (2015), houve uma redução no número médio de eritrócitos policromáticos micronucleados na presença de AE (10 mg / kg de p. c.) no protocolo de co-tratamento do teste de micronúcleo, demonstrando o papel antimutagênico do AE contra a atividade mutagênica do Benzo e do Pireno em sistemas *in vitro* e *in vivo*.

Esses resultados corroboram com nosso estudo, onde demonstramos o potencial efeito antimutagênico do uso de AE associado à DXR em todas as doses testadas, com redução significativa nas frequências de micronúcleos em eritrócitos policromáticos de até 93,4% em 48 horas, quando comparado ao controle positivo. Observamos que o efeito antigenotóxico do AE foi considerado dose-dependente, aumentando a taxa de redução (%)

de acordo com a dose e tempo de exposição, desempenhando um papel importante na quimioprevenção de drogas anticâncer e outros xenobióticos que causam danos diretos ou indiretos no material genético, incluindo DXR.

A possível razão para o comportamento antigenotóxico do AE pode estar relacionada aos seus efeitos antioxidantes (Tavares, et al., 2018), reduzindo assim os danos à estrutura celular e no material genético causados por substâncias de origem natural e sintética.

Um estudo realizado por Kilic, Yeşiloğlu e Bayrak (2014), concluiu que o AE possui uma atividade antioxidante, inibindo 71,2% da peroxidação lipídica. Segundo Firdaus et al. (2018) demonstraram que pré e co-administração do AE em doses de 20 e 40 mg / kg causam uma redução acentuada na produção total de espécies reativas de oxigênio de uma maneira dependente da dose e é considerado um candidato terapêutico promissor contra neurotoxicidade.

Além disso, os fenólicos possuem uma característica de se ligarem ao material genético no local que normalmente ocorreria a reação entre os metabólitos ativos do carcinógeno com o DNA, formando uma ligação carcinógeno – DNA, um passo crucial para o início da carcinogênese (BHATTACHARYA; FIROZI, 1988; DIXIT; GOLD, 1986; KHANDUJA; MAJID, 1993).

Neste caso, o ácido elágico sendo uma lactona fenólica pertencente ao grupo dos taninos hidrolisáveis, poderia se ligar no local que o metabólito ativo do carcinógeno se ligaria ao DNA, ou seja, no local que a doxorrubicina se ligaria com o material genético, diminuindo e/ou evitando os danos provocados ao DNA. Desta forma, o ácido elágico torna-se uma substância com grande potencial, desempenhando efeitos protetores, por meio da atividade antioxidante e antigenotóxica, proporcionando uma alternativa na prevenção ao câncer.

4.2.2.2 Índice de divisão nuclear – citotoxicidade do ácido elágico

A citotoxicidade de uma substância, são diretamente proporcionais às suas concentrações, além do tempo de exposição do indivíduo com o mesmo (KUMAR et al., 2009), sendo considerado um indicativo de toxicidade decorrente da inibição do ciclo de maturação dos eritrócitos, podendo está diretamente ligado com a redução significativa neste parâmetro (MACGREGOR, et al., 1987).

No presente estudo, foram analisados 400 EPCs por animal, tendo um total de 2.000 EPCs por grupo de tratamento, para a análise do índice de divisão nuclear (IDN),

não foram observadas alterações na proliferação celular, demonstrando ausência de efeito citotóxico em sangue periférico (eritrócitos) utilizando diferentes concentrações do ácido elágico (1,4; 2,7; 5,3 e 10,5 mg/kg p. c.) ($p>0,05$), por meio dos protocolos de tratamento empregados no referido estudo, Tabela 10. Além disso, o tratamento com doxorrubicina não apresentou redução na relação eritrócitos policromáticos (PCE) e eritrócitos normocromáticos comparando com o grupo controle negativo ($p>0,05$).

Tabela 10: Índice de divisão nuclear (IDN) em sangue periférico de animais submetidos a diferentes concentrações de AE e/ou DXR e seus respectivos controles (24 horas, 48 horas, 7 dias, 14 dias e 21 dias) após tratamentos.

Tratamento (mg/kg p. c.)	IDN Média $\pm$ DP				
	24 Horas	48 Horas	7 Dias	14 Dias	21 Dias
Controle	0,03 $\pm$ 0,004	0,03 $\pm$ 0,02	0,03 $\pm$ 0,004	0,03 $\pm$ 0,007	0,03 $\pm$ 0,01
1,4	0,02 $\pm$ 0,006	0,02 $\pm$ 0,005	0,02 $\pm$ 0,008	0,02 $\pm$ 0,004	0,02 $\pm$ 0,005
2,7	0,02 $\pm$ 0,004	0,02 $\pm$ 0,002	0,02 $\pm$ 0,009	0,02 $\pm$ 0,005	0,02 $\pm$ 0,005
5,3	0,02 $\pm$ 0,008	0,02 $\pm$ 0,005	0,03 $\pm$ 0,004	0,02 $\pm$ 0,002	0,02 $\pm$ 0,003
10,5	0,03 $\pm$ 0,009	0,02 $\pm$ 0,005	0,03 $\pm$ 0,006	0,03 $\pm$ 0,005	0,03 $\pm$ 0,004
DXR	0,02 $\pm$ 0,002	0,02 $\pm$ 0,002	-	-	-
1,4 + DXR	0,02 $\pm$ 0,004	0,03 $\pm$ 0,002	-	-	-
2,7 + DXR	0,02 $\pm$ 0,003	0,03 $\pm$ 0,003	-	-	-
5,3 + DXR	0,02 $\pm$ 0,002	0,02 $\pm$ 0,003	-	-	-
10,5 + DXR	0,02 $\pm$ 0,005	0,02 $\pm$ 0,003	-	-	-

Valores das médias $\pm$ desvio padrão. 400 eritrócitos foram analisados por animal, sendo um total de 2000 células por grupo de tratamento; Não houve diferenças estatísticas significativas entre os grupos tratados em comparação ao grupo controle. DP: Desvio padrão; IDN: Índice de divisão nuclear; DXR: Doxorrubicina.

De tal modo, a peroxidação lipídica é o principal meio de alteração das funções e da estrutura da membrana plasmática de uma célula, resultando geralmente na morte celular (PERCÁRIO, 2010), desta maneira, substâncias que apresentam um potencial efeito citotóxico podem desencadear alterações funcionais e estruturais nestas células. Neste contexto, um fator que pode ter contribuído para tal resultado neste estudo, foram os efeitos antioxidantes que o ácido elágico apresenta contra diferentes substâncias, diminuindo assim, os danos em diferentes células.

4.2.3 Parâmetros hematológicos

Com base nos resultados adquiridos nas análises hematológicas de camundongos tratados com ácido elágico nas concentrações de 1,4 ; 2,7 ; 5,3 e 10,5 mg / kg, p.c., verificou-se que não houve mudanças significativas nos dados pertinentes ao eritrograma, quando comparados com o grupo controle ($p>0,05$). Além disso, avaliando os parâmetros hematológicos – Leucocitários em camundongos Swiss, foi possível verificar que não houve alterações significativas nos leucócitos totais e na contagem diferencial de leucócitos (neutrófilos, linfócitos, monócitos e eosinófilos) ($p>0,05$) quando comparado com o controle negativo no presente estudo, conforme demonstrado na Tabela 11.

Tabela 11. Efeito do ácido elágico (AE) em diferentes concentrações sobre os parâmetros eritrocitários e leucograma de camundongos Swiss.

Parâmetros	Grupos				
	Controle	1,4 mg/kg/dia	2,7 mg/kg/dia	5,3 mg/kg/dia	10,5 mg/kg/dia
RBC ($10^6/\mu\text{L}$)	7,91 $\pm$ 3,23	8,54 $\pm$ 0,44	8,71 $\pm$ 1,054	8,82 $\pm$ 0,45	8,93 $\pm$ 0,15
HGB (g/dL)	12,2 $\pm$ 3,39	13,8 $\pm$ 0,14	13,5 $\pm$ 0,98	12,95 $\pm$ 0,77	13,55 $\pm$ 0,49
HCT (%)	42,5 $\pm$ 1,53	43,25 $\pm$ 0,35	41,65 $\pm$ 1,32	39,7 $\pm$ 0,98	40,1 $\pm$ 1,27
Leucócitos totais ($10^3/\mu\text{L}$)	7,41 $\pm$ 0,36	6,64 $\pm$ 0,31	6,87 $\pm$ 0,50	7,38 $\pm$ 0,53	8,28 $\pm$ 0,27
Neutrófilos (%)	18,95 $\pm$ 1,17	29,85 $\pm$ 0,21	22,75 $\pm$ 1,16	21,55 $\pm$ 0,77	20,15 $\pm$ 1,48
Linfócitos (%)	73,5 $\pm$ 1,52	65,8 $\pm$ 1,11	63,85 $\pm$ 0,77	66,15 $\pm$ 1,20	78,2 $\pm$ 0,28
Monócitos (%)	1,7 $\pm$ 0,42	1,35 $\pm$ 0,07	1,45 $\pm$ 1,06	1,8 $\pm$ 0,28	1,9 $\pm$ 2,12
Eosinófilos (%)	1,7 $\pm$ 0,56	1,55 $\pm$ 0,07	1,75 $\pm$ 0,21	1,75 $\pm$ 0,07	1,1 $\pm$ 0,56

Os valores foram expressos como média $\pm$ Desvio padrão ($n=5$). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos avaliados (ANOVA e Teste de Tukey) ($p<0,05$). RBC (Eritrócitos totais), HGB (Hemoglobina), HCT (Hematócrito).

As alterações hematológicas podem ser utilizadas como um indicador precoce na triagem de possíveis efeitos toxicológicos decorrentes da exposição ou do uso de xenobióticos nos tecidos. Sendo assim, as avaliações dos possíveis efeitos citotóxicos de diferentes substâncias podem ser observadas por alterações no citoesqueleto de eritrócitos de forma direta ou indireta, na liberação extracelular de hemoglobina (hemólise), além da alteração no metabolismo celular e na permeabilidade iônica das hemácias, levando a anormalidades na morfologia celular, desta forma, essas análises são consideradas um fator determinante na estabilidade da membrana celular (FARAG; ALAGAWANY, 2018). Isto pode explicar os resultados obtidos neste estudo, não havendo alterações relevantes

nos dados do eritrograma (RBC, Hb, Ht) e parâmetros hematológicos *in vivo*. Com base nos resultados obtidos neste estudo, podemos supor que o uso de AE na concentração utilizada é seguro.

4.2.4 Análise macroscópica, peso relativo e microscópica dos órgãos

Considerando os parâmetros cor, textura, tamanho e forma, não foram observadas alterações macroscópicas nos órgãos vitais. No entanto, foi observada uma alteração significativa da massa hepática relativa com o uso de AE na concentração de 5,3 mg / kg, p.c. ($p < 0,05$) comparado ao grupo controle. Além disso, o grupo tratado com DXR também apresentou um aumento significativo do peso médio do fígado ($p < 0.01$) em relação ao grupo controle, demonstrado na Tabela 12.

Tabela 12. Efeito do ácido elágico (AE) sobre a massa média dos órgãos dos animais tratados com diferentes concentrações.

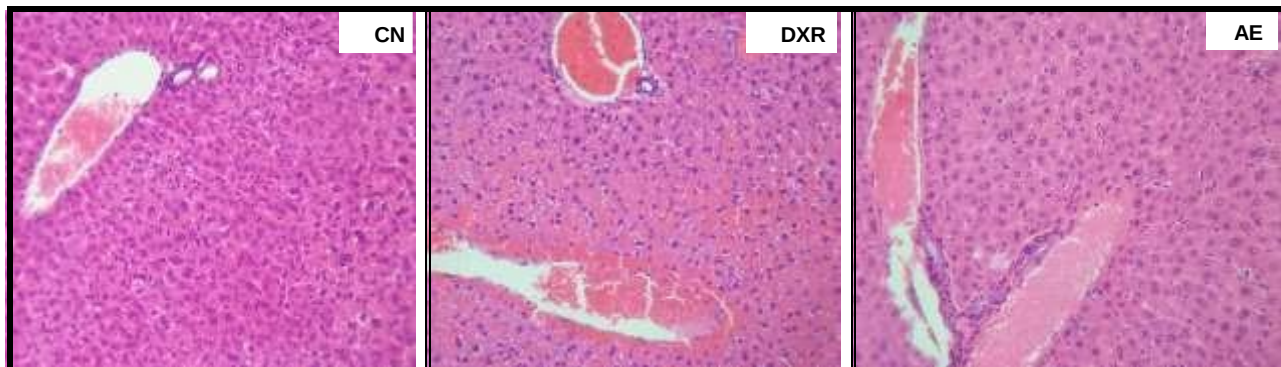
Tratamento	Dose (mg/kg/dia)	Órgãos (g/100g de massa corpóreo)				
		Fígado	Baço	Coração	Rim Direito	Rim Esquerdo
Controle	-	3,64 ± 0,42	0,23 ± 0,0004	0,50 ± 0,04	0,82 ± 0,13	0,73 ± 0,07
DXR	15	6,53 ± 0,10 **	0,18 ± 0,01	0,53 ± 0,004	0,63 ± 0,17	0,70 ± 0,06
	1,4	4,25 ± 0,20	0,20 ± 0,02	0,51 ± 0,01	0,64 ± 0,02	0,67 ± 0,02
Ácido Elágico	2,7	4,59 ± 0,14	0,18 ± 0,02	0,59 ± 0,04	0,71 ± 0,02	0,67 ± 0,01
	5,3	5,33 ± 0,53 *	0,25 ± 0,03	0,74 ± 0,15	0,75 ± 0,05	0,70 ± 0,09
	10,5	4,56 ± 0,38	0,25 ± 0,08	0,62 ± 0,19	0,77 ± 0,05	0,74 ± 0,04

Os valores foram expressos como média ± desvio padrão. Diferenças significativas entre os valores foram expressas como * ($p < 0.05$) e ** ($p < 0.01$) em comparação com o grupo controle (negativo) (ANOVA e Teste de Tukey). DXR: Doxorubicina.

Tendo em vista que não houve variação importante entre os subgrupos, operou-se por desprezarmos os resultados em conjuntos. Nos parâmetros histopatológicos, algumas alterações morfológicas ocasionais foram observadas microscopicamente (Figura 25, 26 27 e 28); ambos nos animais tratados e não tratados com AE. Em contrapartida, evidenciaram-se algumas alterações distintas nos animais tratados com AE: no baço a polpa branca era hiperplásica e algumas vezes desorganizada, discreta focagem hemorrágica no coração, nos rins discreto inchaço das áreas tubulares do epitélio com áreas de cilindro hialinas, seções de tubulares e hemorragia intersticial na maioria dos casos e vasos congestivos nas proximidades de áreas de hemorragia. Nesse contexto, o

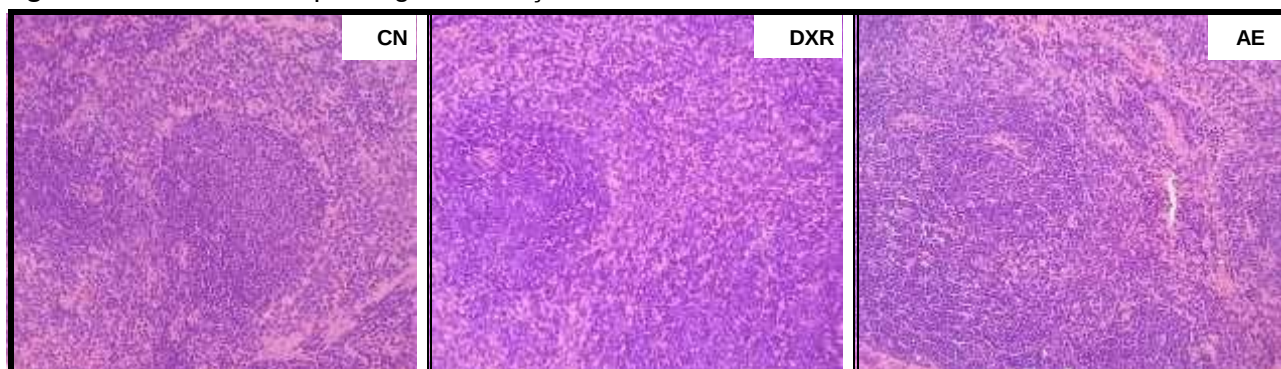
tratamento com AE não induziu lesões graves nos órgãos quando comparado ao grupo controle, enquanto essas alterações podem ser resultado de baixa toxicidade relacionada ao uso em longo prazo do AE.

Figura 25: Análise histopatológica do fígado.



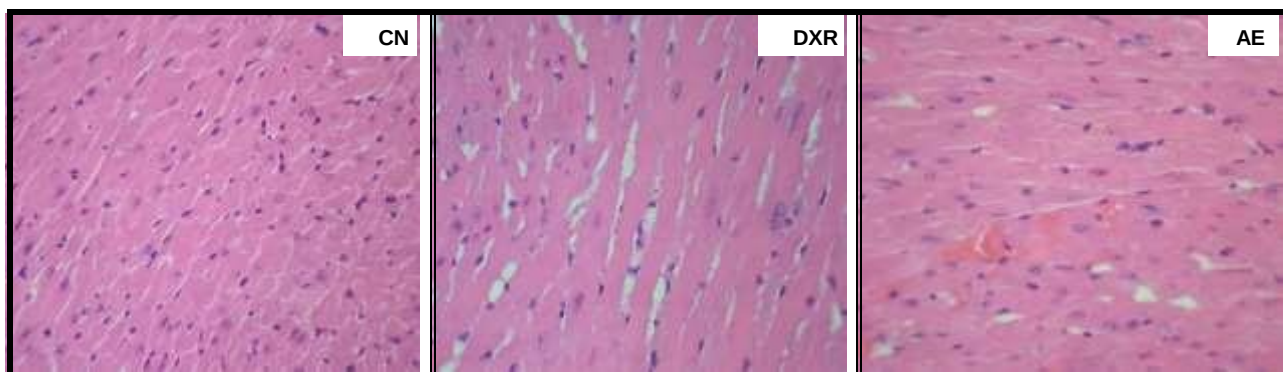
Legenda: Análise histopatológica do fígado, observou-se no **grupo CN:** Cordões de hepatócitos com discreta tumefação celular, congestão portal e da veia terminal, além de leve degeneração hidrópica. Hiperplasia das células de Kupffer podia ser observada em todos os animais, porém não houve indícios de hemorragia sinusoidal ou focos de células inflamatórias. **Grupo DXR:** Cordões de hepatócitos com moderada tumefação celular, focos de degeneração hidrópica e intensas congestão portal e da veia termina e hiperplasia das células de Kupffer. Hemorragia sinusoidal e áreas de edema foram verificadas em duas amostras, porém, não se observaram focos de células inflamatórias. **No grupo tratado com AE:** observou-se cordões de hepatócitos com leves tumefação celular e degeneração hidrópica, congestão portal e da veia terminal, além de moderada hiperplasia das células de Kupffer. Não houve indícios de hemorragia sinusoidal ou focos de células inflamatórias.

Figura 26: Análise histopatológica do baço.



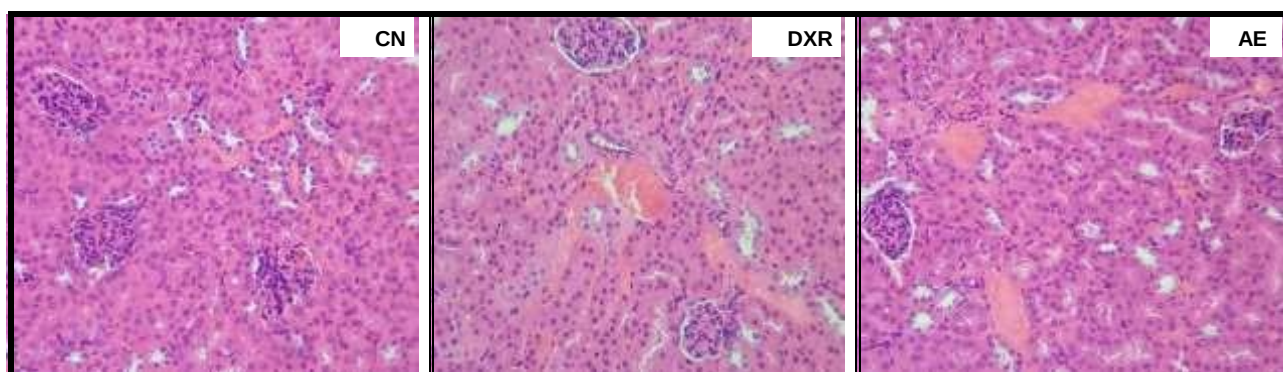
Legenda: Análise histopatológica do baço, observou-se no **grupo CN:** Polpa branca constituída por bainha de linfócitos (T) periarteriais situadas excentricamente em relação às artérias centrais e nódulos esplênicos (corpúsculos de Malpighi) com centro germinativo, este último, em sua maioria. Em continuidade, há polpa vermelha composta por eritrócitos, seios esplênicos e trabéculas esplênicas. **Grupo DXR:** Polpa branca constituída por bainha de linfócitos (T) periarteriais situadas excentricamente em relação às artérias centrais e nódulos esplênicos com centro germinativo, este último, em sua maioria. Em uma das amostras, a polpa branca se encontrava hiperplásica. Há polpa vermelha composta por eritrócitos, seios esplênicos e trabéculas esplênicas. **No grupo tratado com AE:** observou-se polpa branca hiperplásica e por vezes desorganizadas. Em continuidade, há polpa vermelha composta por eritrócitos, seios esplênicos e trabéculas esplênicas.

Figura 27: Análise histopatológica do coração.



Legenda: Análise histopatológica do coração (síntese dos três grupos): observou-se nas amostras, tecido muscular estriado cardíaco, apresentando preservação de fibras longitudinais e transversais, e ausência de pigmentos de hemossiderina ou lipofuscina. A presença de focos de discreta hemorragia foi visualizada. Raramente, o quadro histológico foi acompanhado da presença de focos de adipócitos típicos adjacentes ao tecido muscular.

Figura 28: Análise histopatológica dos rins



Legenda: Análise histopatológica dos rins, observou-se no **Grupo CN:** Amostras representadas por córtex e medula renais com distribuição normal das estruturas glomerulares e tubulares, com ausência de necrose, glomerulopatias e glomerulonefrites. Não foram observados tumefação moderada do epitélio tubular com áreas focais de degeneração vacuolar, porém cilindro-hialinos puderam ser vistos em metade da amostra. **Grupo DXR:** Amostras representadas por córtex e medula renais com distribuição normal das estruturas glomerulares e tubulares, com ausência de necrose, glomerulopatias e glomerulonefrites. Não foram observados tumefação moderada do epitélio tubular, porém notáveis cilindro hialinos e áreas de Hemorragia tubular e intersticial foram observados na maioria dos casos. **No grupo tratado com AE:** observou-se córtex e medula renais com distribuição normal das estruturas glomerulares e tubulares, com ausência de necrose, glomerulopatias e glomerulonefrites. Foram observados discreta tumefação do epitélio tubular com áreas de cilindro hialinos e trechos de hemorragia tubular e intersticial na maioria dos casos e vasos congestos nas proximidades das áreas de hemorragia também podiam ser observados.

Diversos parâmetros como hematológicos e anatomopatológicos podem ser utilizados para determinar evidências de toxicidade de diversas substâncias (VIDAL et al., 2003). Neste estudo, foi verificado uma alteração significativa da massa relativa do fígado com o uso do ácido elágico (5,3 mg / kg, p. c.) em comparação ao grupo controle, podendo estar relacionado à suscetibilidade do fígado as lesões pós substâncias, sendo este

órgão, o local de metabolização, concentração e biotransformação dessas substâncias (BISCHOFF; MUKAI; RAMAIAH, 2018).

Além disso, a ocorrência esporádica de lesões foi observada nos órgãos, tanto nos grupos de controle tratados como nos não tratados. Nesse contexto, o tratamento com AE não induziu lesões graves nos órgãos, enquanto as alterações observadas são decorrentes da baixa toxicidade relacionada ao uso prolongado desta substância.

Assim, a peroxidação lipídica é o principal meio de alterar as funções e estrutura da membrana plasmática de uma célula, geralmente resultando em morte celular (Percario, 2010). Isso pode explicar nossos achados, uma vez que não foram observadas mudanças significativas na apreciação histopatológica, resultando em pouca ou nenhuma toxicidade em comparação com o grupo controle.

Os efeitos antioxidantes que a AE apresenta podem ter causado a diminuição desses danos oxidativos nas células do corpo. Isso pode explicar a baixa toxicidade do ácido elágico nos órgãos. Em resumo, nossos resultados mostraram que a AE não é genotóxica, citotóxica e não altera parâmetros hematológicos. Além disso, apresentou um efeito antígeno-tóxico substancial, com uma taxa de redução de aproximadamente 93,4% em um período de 48 horas e, como tal, poderia ser considerada uma alternativa importante na quimioprevenção de doenças relacionados danos oxidativos e ao DNA.

Diante dos resultados obtidos:

- A análise do efeito do ECFPG e do AE sobre a massa corpórea dos animais tratados com diferentes concentrações dessas substâncias, não demonstraram quaisquer alterações significativas neste parâmetro, corroborando com resultados já descritos na literatura em que não foram encontrados alterações neste perfil.
- Na avaliação dos efeitos genotóxico e antigenotóxico em eritrócitos policromáticos de camundongos Swiss utilizando o ECFPG e o AE não foram evidenciados um aumento na frequência de EPCMNs nos grupos tratados com diferentes concentrações (24 horas, 48 horas, 7 dias, 14 dias e 21 dias). Entretanto, observou-se uma diminuição dessa frequência de EPCMNs utilizando as mesmas concentrações do ECFPG e/ou AE + DXR (24 e 48 horas). Neste contexto, foi constatando ausência de efeito genotóxico e a presença do efeito antigenotóxico do ECFPG e do AE, sendo as mesmas consideradas dose dependente, atuando assim, contra os danos oxidativos produzidos por diversas substâncias, incluindo a doxorrubicina.
- Na análise do Índice de Divisão Nuclear (IDN), os resultados obtidos entre todos os grupos tratados, não foram evidenciados diferenças significativas quanto proliferação celular, demonstrando ausência de efeito citotóxico.
- Na verificação do efeito do ECFPG e do AE sobre os parâmetros hematológicos (série branca e série vermelha), não foi observado alterações significativas neste parâmetro.
- Na avaliação das características anatomopatológicas do fígado, baço, coração e rins dos animais submetidos aos tratamentos com ECFPG e AE, observaram-se pequenas lesões em alguns órgãos, evidenciando uma fraca toxicidade decorrente da administração constante dessas substâncias, demonstrando que o uso prolongado pode desencadear essas alterações em determinados órgãos (fraca toxicidade). Sugere-se a condução de estudos futuros relacionados à segurança do ECFPG e do AE, incluindo um estudo crônico dos mesmos.

- AHAD, S.; TANVEER, S.; MALIK, T. A.; NAWCHOO, I. A. Anticoccidial activity of fruit peel of *Punica granatum* L. **Microbial Pathogenesis**, v. 116, p. 78-83, 2018.
- AHARONI, S.; LATI, Y.; AVIRAM, M.; FUHRMAN, B. Pomegranate juice polyphenols induce a phenotypic switch in macrophage polarization favouring a M2 antiinflammatory state. **Biofactors**, v.41, n. 1, p. 44-51, 2015.
- ALLEN, C. T.; PEDEN-ADAMS, M. M.; EUDALY, J.; KEIL, D. E. Subchronic Exposure to Ellagic Acid Impairs Cytotoxic T-Cell Function and Suppresses Humoral Immunity in Mice. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, v. 25, n. 3, p. 409-422, 2003.
- AL-OBAIDI, M. M. J.; AL-BAYATY, F. H.; AL-BATRAN, R.; HASSANDARVISH, P.; ROUHOLLAHI, E. Protective effect of ellagic acid on healing alveolar bone after tooth extraction in rat – A histological and immunohistochemical study. **Archives of Biology**, v. 59, n. 9, p. 987-999, 2014.
- ALVES, J. M.; MUNARI, C. C.; MONTEIRO NETO, M. A. B.; FURTADO, R. A.; SENEDESE, J. M.; BASTOS, J. K.; TAVARES, D. C. In vivo protective effect of *Copaifera langsdorffii* hydroalcoholic extract on micronuclei induction by doxorubicin. **Journal of Applied Toxicology**, v. 33, n. 8, p. 854-860, 2013.
- ANVISA, B. **Guia para condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos**. Versão 2. Anvisa, Brasília. ALP, H, 970-975, 2013.
- ARGENTA, J. A.; PASQUEL, M.; PEREIRA, C. V.; DIAS, D. R.; BARBOSA, R. A.; PEREIRA, L. J. Efeito do extrato de romã (*Punica granatum*) sobre bactérias cariogênicas: estudo in vitro e in vivo. **Arquivos em Odontologia**, v. 48, n. 4, p. 218-226, 2012.
- BANIHANI, S. A.; MAKAHLEH, S. M.; EL-AKAWI, Z.; AL-FASHTAKI, R. A.; KHABOUR, O. F.; GHARIBEH, M.Y.; AL-KHASIEB, N. J. Fresh pomegranate juice ameliorates insulin resistance, enhances β -cell function, and decreases fasting serum glucose in type 2 diabetic patients. **Nutrition Research**, v. 34, n. 10, p. 862-867, 2014.
- BANKS W. J., “**Histologia Veterinária Aplicada**,” 2nd ed., Editora Manole Ltda., Brasil, 1992, pp. 376 - 381.
- BAPODARA, M.; NAGANI, K.; CHANDA, S. Pharmacognostic and physicochemical study of *Punica granatum* L. leaf. **Pharmacognosy Journal**, v. 3, n. 21, p. 29-32, 2011.

BARBIEIRI, D.; WISNIEWSKI, E.; SALETE, M.; WISNIEWSKI, W.; ROMAN, S. S.; CHICOTA, L. C.; CEREZER, S. M.; DALLAGO, R. G. Animal toxicity caused by formaldehyde and complucad® in wistar rats: acute exposure. **Revista Interdisciplinar de Estudos Experimentais**, v. 2, n. 4, p. 114 - 119, 2010.

BASSIRI JAHROMI, S.; POURSHAFIE, M. R.; MIRABZADEH, E.; TAVASOLI, A.; KATIRAEI, F.; MOSTAFAVI, E.; ABBASIAN, S. *Punica granatum* Peel Extract Toxicity in Mice. **Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products**, v. 10, n. 4, 2015.

BEIRUTHY, I. W.; KAZAN, R. S. Étude corrélationnelle sur les facteurs prédictifs de la pratique du test de dépistage du cancer du col utérin chez les femmes fréquentant les centres médico-sociaux à Zahlé (Liban). **Revue Francophone Internationale de Recherche Infirmière**, v. 2, n. 1, p. 31-40, 2016.

BEKIR, J.; MARS, M.; SOUCHARD, J. P.; BOUAJILA, J. Assessment of antioxidant, anti-inflammatory, anti-cholinesterase and cytotoxic activities of pomegranate (*Punica granatum*) leaves. **Food and Chemical Toxicology**, v. 55, p. 470-475, 2013.

BERNI, A.; GROSSI, M. R.; PEPE, G.; FILIPPI, S.; MUTHUKUMAR, S.; PAPESCHI, C.; PALITTI, F. Protective effect of ellagic acid (EA) on micronucleus formation induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) in mammalian cells, in in vitro assays and in vivo. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 746, n. 1, p. 60-65, 2012.

BHASKAR, A.; KUMAR, A. Antihyperglycemic, antioxidant and hypolipidemic effect of *Punica granatum* L flower extract in streptozotocin induced diabetic rats. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 2, n. 3, p. S1764-S1769, 2012.

BHATTACHARYA, R. K.; FIROZI, P. F. Effect of plant flavonoids on microsome catalysed reactions of aflatoxin B1 leading to activation and DNA adduct formation. **Cancer Letters**, v. 39, n. 1, p. 85-91, 1988.

BISCHOFF, K.; MUKAI, M.; RAMAIAH, S. K. **Liver toxicity. In Veterinary Toxicology** (Third Edition) (pp. 239-257), 2018.

BOEHNING, A. L.; ESSIEN, S. A.; UNDERWOOD, E. L.; DASH, P. K.; BOEHNING, D. Cell type-dependent effects of ellagic acid on cellular metabolism. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 106, p. 411-418, 2018.

BRAQUEHAIS, I.; VASCONCELOS, F.; RIBEIRO, A.; DA SILVA, A. R. A.; FRANCA, M.; DE LIMA, D. R.; MAGALHÃES, F. Estudo preliminar toxicológico, antibacteriano e fitoquímico do extrato etanólico das folhas de *Jatropha mollissima* (Pohl) Baill. (pinhão-bravo, Euphorbiaceae), coletada no Município de Tauá, Ceará, Nordeste Brasileiro. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 18, n. 2, supl. 1, p. 582-587, 2016.

BRASIL; MINISTÉRIO DA SAÚDE (MS). **Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. Brasília, DF, 2009.

BREITBACH, U.B; NIEHUES, M.; LOPES, P.N; FARIA, J.E; BRANDÃO, M.G. Amazonian Brazilian medicinal plants described by CFP von Martius in the 19th century. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 147, n. 1, p. 180-189, 2013.

CALZONE, A.; PODDA, A.; LORENZINI, G.; MASERTI, B. E.; CARRARI, E.; DELEANU, E.; PELLEGRINI, E. Cross-talk between physiological and biochemical adjustments by *Punica granatum* cv. Dente di cavallo mitigates the effects of salinity and ozone stress. **Science of The Total Environment**, v. 656, p. 589-597, 2019.

CARNEIRO, A. B.; AURÉLIO, P.; SERRÃO, E. J. P.; RIBEIRO, I. F; MAGALHÃES, M. R. G.; MONTEIRO NETO, M. A. B. Efeito da *Astrocaryum aculeatum* (Tucumã) na toxicidade da Doxorubicina: modelo experimental in vivo. **Acta Paulista de Enfermagem**, v. 30, p. 233-239, 2017.

ÇAVDAR, H. K.; YANIK, D. K.; GOGUS, F.; GOK, U. Optimisation of Microwave-Assisted Extraction of Pomegranate (*Punica granatum* L.) Seed Oil and Evaluation of Its Physicochemical and Bioactive Properties. **Food Technology and Biotechnology**, v. 55, n. 1, p. 86, 2017.

CAYIR, K; KARADENIZ, A.; SIMSEK, N; YILDIRIM, S.; KARAKUŞ, E.; KARA, A.; AKKOYUN, HT; SENGÜL, E. Pomegranate seed extract attenuates chemotherapy- induced acute nephrotoxicity and hepatotoxicity in rats. **Journal of Medicinal Food**, v.14, n.10, p.1254-1262, 2011.

COLARES, L. F.; SANTOS NETO, A. R.; CORDEIRO, I. H.; CASTRO, S. B. R. D.; VERLY, R. M.; ALVES, C. C. D. S.; CARLI, A. D. P. Detection of protease inhibitors in seeds of *Punica granatum*. **Química Nova**, v. 40, n. 3, p. 270-274, 2017.

ÇÖMELEKOĞLU, ÜLKÜ; MAZMANCI, BİRGÜL; ARPACI, ABDULLAH. Investigation on the Liver Functions Agriculturel Workers Chronically Exposed to Pesticides. **Turkish Journal of Biology**, v. 24, n. 3, p. 461-466, 2000.

COSTA, C. R. Avaliação das atividades angiogênica/antiangiogênica, mutagênica/antimutagênica da fosfoetanolamina. **Dissertação (Mestrado)**. Pontifícia Universidade Católica de Goiás. Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais e Saúde. Goiânia-GO, 2018.

DAI, J.; MUMPER, R. J. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. **Molecules**, v. 15, n. 10, p. 7313-7352, 2010.

DALVI, L. T. Estudo da capacidade antioxidante do polifenol ácido elágico *in vitro* e em *Saccharomyces cerevisiae* selvagem e deficiente em superóxido dismutase 1. **Tese**

(Doutorado). Universidade de Brasília. Pós-graduação em Nutrição Humana pela Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília. BRASÍLIA, 2014.

DA FONSECA, C. A.; PEREIRA, D. G. Aplicação da genética toxicológica em planta com atividade medicinal. **Infarma-Ciências Farmacêuticas**, v. 16, n. 7/8, p. 51-54, 2013.

DAS, A. K., MANDAL, S. C., BANERJEE, S. K., SINHA, S., DAS, J., SAHA, B. P., PAL, M. Studies on antidiarrhoeal activity of *Punica granatum* seed extract in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 68, n. 1-3, p. 205-208, 1999.

DASSPRAKASH, M. V.; ARUN, R.; ABRAHAM, S. K.; PREMKUMAR, K. In vitro and in vivo evaluation of antioxidant and antigenotoxic potential of *Punica granatum* leaf extract. **Pharmaceutical Biology**, v. 50, n. 12, p. 1523-1530, 2012.

DA SILVA, F. C.; DE BRITO BARROS, M. Â.; VIANA, R. R.; ROMÃO, N. F.; DE SOUSA OLIVEIRA, M.; OLIVEIRA MENEGUETTI, D. U. Avaliação de mutagênese provocada por sulfato de ferro através do teste micronúcleo em células da medula óssea de camundongos. **Revista Científica da Faculdade de Educação e Meio Ambiente**, v. 2, n. 1, p. 13-21, 2011.

DE AMORIM, A.; BORBA, H. R.; ARMADA, J. L. Test of mutagenesis in mice treated with aqueous extracts from *Punica granatum* L.(Pomegranate). **Revista Brasileira de Farmacia**, v. 76, n. 4, p. 110-111, 1995.

DE CARVALHO, A. C.; XAVIER, F. B. Introdução de carboidratos simples na dieta de indivíduos diabéticos tipo i. **Revista uningá**, v. 39, n. 1, 2018.

DE OLIVEIRA, L. S.; MUZITANO, M. F.; COUTINHO, M. A. S.; DE MELO, G. O.; COSTA, S. S. Plantas medicinais como recurso terapêutico em comunidade do entorno da reserva biológica do tinguá, RJ, Brasil–metabólitos secundários e aspectos farmacológicos. **InterSciencePlace**, v. 1, n. 17, 2015.

DIKMEN, M.; OZTURK, N.; OZTURK, Y. The antioxidant potency of *Punica granatum* L. Fruit peel reduces cell proliferation and induces apoptosis on breast cancer. **Journal of Medicinal Food**, v. 14, n. 12, p. 1638-1646, 2011.

DIXIT, R.; GOLD, B. Inhibition of N-methyl-N-nitrosourea-induced mutagenicity and DNA methylation by ellagic acid. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 83, n. 21, p. 8039-8043, 1986.

DOLL, R.; PETO, R. The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, v. 66, n. 6, p. 1192-1308, 1981.

ELBATANONY, M. M.; EL-FEKY, A. M.; HEMDAN, B. A.; EL-LIETHY, M. A. Assessment of the antimicrobial activity of the lipoidal and pigment extracts of *Punica granatum* L. leaves. **Acta Ecologica Sinica**, v. 39, n. 1, p. 89-94, 2019.

ELFALLEH, W.; NASRI, N.; MARZOUGUI, N.; THABTI, I.; M'RABET, A.; YAHYA, Y.; FERCHICHI, A. Physico-chemical properties and DPPH-ABTS scavenging activity of some local pomegranate (*Punica granatum*) ecotypes. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 60, n. sup2, p. 197-210, 2009.

ELHEMELY, M. A.; OMAR, H. A.; AIN-SHOKA, A. A.; EL-LATIF, H. A. A.; ABO- YOUSSEF, A. M.; EL SHERBINY, G. A. Rosuvastatin and ellagic acid protect against isoproterenol-induced myocardial infarction in hyperlipidemic rats. **Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 3, n. 4, p. 239-246, 2014.

ERMOLAEVA, M. A.; SCHUMACHER, B. Systemic DNA damage responses: organismal adaptations to genome instability. **Trends in Genetics**, v. 30, n. 3, p. 95-102, 2014.

FARAG, M. R.; ALAGAWANY, M. Erythrocytes as a biological model for screening of xenobiotics toxicity, **Chemico-Biological Interactions**, v. 279, p. 73-83, 2018.

FEITOSA, M. H. A.; SOARES, L. L.; BORGES, G. A.; ANDRADE, M. M.; COSTA, S. D. M. Inserção do Conteúdo Fitoterapia em Cursos da Área de Saúde. **Revista Brasileira de Educação Médica**, v. 40, n. 2, p. 197-203, 2016.

FELIX, L. C. M.; DE MEDEIROS, V. C. M.; MOLINA, V. B. C. Análise do conhecimento e consumo de alimentos fontes de fósforo por pacientes portadores de insuficiência renal crônica em tratamento dialítico. **journal – Braspen**, v. 33, n. 1, p. 15-20, 2018.

FERREIRA, A.F.A. Propagação vegetativa de Romãzeira (*Punica granatum* L.). **Tese (Doutorado)**. Universidade de São Paulo. Piracicaba, 2017.

FIRDAUS, F.; ZAFEER, M. F.; ANIS, E.; AHMAD, M.; AFZAL, M. Ellagic acid attenuates arsenic induced neuro-inflammation and mitochondrial dysfunction associated apoptosis. **Toxicology Reports**, v. 5, p. 411-417, 2018.

FRANKE, S. I. R.; PRÁ, D.; DA SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J. A. P. Possible repair action of Vitamin C on DNA damage induced by methyl methanesulfonate, cyclophosphamide, FeSO₄ and CuSO₄ in mouse blood cells in vivo. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 583, n. 1, p. 75-84, 2005.

GONÇALVES, Y. S. Fontes e doses de potássio na produtividade e qualidade da mandioca de mesa. **Dissertação (Mestrado)**. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Pós- graduação em Produção Vegetal. 2018.

GONZÁLEZ-TRUJANO, M. E.; PELLICER, F.; MENA, P.; MORENO, D. A.; GARCÍA-VIGUERA, C. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of a pomegranate (*Punica granatum* L.) extract rich in ellagitannins. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 66, n. 4, p. 395-399, 2015.

GONZÁLEZ-SARRÍAS, A.; GARCÍA-VILLALBA, R.; NÚÑEZ-SÁNCHEZ, M. A.; TOMÉ-CARNEIRO, J.; ZAFRILLA, P.; MULERO, J.; FRANCISCO, A.; TOMÁS-BARBERÁN; ESPÍN, J.C. Identifying the limits for ellagic acid bioavailability: A crossover pharmacokinetic study in healthy volunteers after consumption of pomegranate extracts. **Journal of Functional Foods**, v. 19, p. 225-235, 2015.

GOPALAKRISHNAN, L.; RAMANA, L. N.; SETHURAMAN, S.; KRISHNAN, U. M. Ellagic acid encapsulated chitosan nanoparticles as anti-hemorrhagic agent. **Carbohydrate Polymers**, v. 111, p. 215-221, 2014.

GROSSI, M. R.; BERNI, A.; PEPE, G.; FILIPPI, S.; MESCHINI, R.; PAPESCHI, C.; PALITTI, F. Evaluation of the effects of ellagic acid (EA) on 7, 12-dimethylbenz (α) anthracene (DMBA) induced micronuclei in mammalian cells in vitro and in vivo. **Toxicology Letters**, v. 224, n. 2, p. 240-245, 2014.

GUL, F.; SHINWARI, Z. K.; AFZAL, I. Screening of indigenous knowledge of herbal remedies for skin diseases among local communities of North West Punjab, Pakistan. **Pakistan Journal of Botany**, v. 5, p. 1609-1616, 2012.

HAYASHI, M.; SUTOU, S.; SHIMADA, H.; SATO, S. SASAKI, Y.F; WAKATA, A. Diference between intraperitoneal and oral gavage application in the micronucleus test. The 3rd collaborative study by CSGMT/JEMS-MMS. **Mutation Research/Genetic Toxicology**, v. 223, n. 4, p. 329-344, 1989.

HERNANDES, L. C.; AISSA, A. F.; DE ALMEIDA, M. R.; DARIN, J. D. A. C.; RODRIGUES, E.; BATISTA, B. L.; ANTUNES, L. M. G. In vivo assessment of the cytotoxic, genotoxic and antigenotoxic potential of maná-cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal) fruit. **Food Research International**, v. 62, p. 121-127, 2014.

HMID, I.; ELOTHMANI, D.; HANINE, H.; OUKABLI, A.; MEHINAGIC, E. Comparative study of phenolic compounds and their antioxidant attributes of eighteen pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars grown in Morocco. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 10, p. S2675-S2684, 2017.

HINTZSCHE, H.; HEMMANN, U.; POTTH, A.; UTESCH, D.; LOTT, J.; STOPPER, H. Fate of micronuclei and micronucleated cells. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 771, p. 85-98, 2017.

ISMAIL, T.; SESTILI, P.; AKHTAR, S. Pomegranate peel and fruit extracts: a review of potential anti-inflammatory and anti-infective effects. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 143, n. 2, p. 397-405, 2012.

JAIN, V.; MURUGANANTHAN, G.; DEEPAK, M.; VISWANATHA, G. L.; MANOHAR, D. Isolation and standardization of various phytochemical constituents from methanolic extracts of fruit rinds of *Punica granatum*. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 9, n. 6, p. 414-420, 2011.

JUNQUEIRA, L. C. U.; JUNQUEIRA L. M. M. S. **Técnicas Básicas de Citologia e Histologia**. Rio de Janeiro. Ed. Guanabara Koogan, 1983.

KAMPA, M.; NIFLI, A.P.; NOTAS, G.; CASTANAS, E. Polyphenols and cancer cell growth. **Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology**, 159, p. 79-113, 2007.

KASAI, K.; YOSHIMURA, M.; KOGA, T.; ARII, M.; KAWASAKI, S. Effect of oral administration of ellagic acid-rich pomegranate extract on ultraviolet-induced pigmentation in the human skin. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, v. 52, n. 5, p. 383- 388, 2006.

KHANDUJA, K.L.; MAJID, S. Ellagic acid inhibits DNA binding of benzo(a)pyrene activated by different modes. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition**, v. 15, n. 1, p. 1-9, 1993.

KHAN, I.; RAHMAN, H.; EL-SALAM, N. M. A.; TAWAB, A.; HUSSAIN, A.; KHAN, T. A.; MURAD, W. *Punica granatum* peel extracts: HPLC fractionation and LC MS analysis to quest compounds having activity against multidrug resistant bacteria. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 17, n. 1, p. 247, 2017.

KHWAIRAKPAM, A. D.; BORDOLOI, D.; THAKUR, K. K.; MONISHA, J.; ARFUSO, F.; SETHI, G.; KUNNUMAKKARA, A. B. Possible use of *Punica granatum* (Pomegranate) in cancer therapy. **Pharmacological Research**, 2018.

KILIC, I.; YEŞİLOĞLU, Y.; & BAYRAK, Y. Spectroscopic studies on the antioxidant activity of ellagic acid. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v. 130, p. 447-452, 2014.

KOÇ N. D; MUSLU M. N.; SESAL C.; KAYHAN F.E. Histopathological effects of malathion and endosulfan on blood cells of Wistar albino rats (*Rattus norvegicus*). **Journal of Applied Biological Sciences**, n. 3, p. 105-108, 2008.

KUMAR, M. R.; AITHAL, K.; RAO, B. N.; UDUPA, N.; RAO, B. S. Cytotoxic, genotoxic and oxidative stress induced by 1,4-naphthoquinone in B16F1 melanoma tumor cells. **Toxicol In Vitro**, v.23, n.2, p.242-250, 2009.

LARROSA, M.; GARCÍA-CONESA, M. T.; ESPÍN, J. C.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A. Ellagitannins, ellagic acid and vascular health. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 31, n. 6, p. 513-539, 2010.

- LEE, C. J.; CHEN, L. G.; LIANG, W. L.; WANG, C. C. Anti-inflammatory effects of *Punica granatum* Linne in vitro and in vivo. **Food Chemistry**, v. 118, n. 2, p. 315-322, 2010.
- LIMA, I. E. O.; NASCIMENTO, L. A. M.; SILVA, M. S. Comercialização de Plantas Medicinais no Município de Arapiraca-AL. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 18, n. 2, p. 462-472, 2016.
- LOIZZO, M.R.; AIELLO, F.; TENUTA, M. C; LEPORINI, M.; FALCO, T.; TUNDIS, R. Pomegranate (*Punica granatum* L.). In: **Nonvitamin and Nonmineral Nutritional Supplements**. Academic Press, p. 467-472, 2019.
- LU, J.; LI, J.; HU, Y.; GUO, Z.; SUN, D.; WANG, P.; WANG, J. Chrysophanol protects against doxorubicin-induced cardiotoxicity by suppressing cellular PARylation. **Acta Pharmaceutica Sinica B.**, 2018.
- LUCIO NETO, M. P. Avaliação tóxica, citotóxica, genotóxica e mutagência do composto 3-(2-cloro-6-fluorobenzil) – imidazolidina - 2, 4 - diona em células eucariotas. 120 p. **Tese de (Doutorado)**, Universidade Federal do Piauí, 120 p., 2011.
- MACGREGOR, J. T.; HEDDLE, J. A.; HITE, M.; MARGOLIN, B. H.; RAMEL, C.; SALAMONE, M. F.; WILD, D. Guidelines for the conduct of micronucleus assays in mammalian bone marrow erythrocytes. **Mutation Research/Genetic Toxicology**, v. 189, n. 2, p. 103-112, 1987.
- MACGREGOR, J. T.; WEHR, C. M.; GOULD, D. H. Clastogen-induced micronuclei in peripheral blood erythrocytes: The basis of an improved micronucleus test. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 2, n. 4, p. 509-514, 1980.
- MANSOURIAN, A.; BOOJARPOUR, N.; ASHNAGAR, S.; BEITOLLAHI, J. M.; SHAMSHIRI, A. R. The comparative study of antifungal activity of *Syzygium aromaticum*, *Punica granatum* and nystatin on *Candida albicans*; an in vitro study. **Journal de Mycologie Médicale/Journal of Medical Mycology**, v. 24, n. 4, p. e163-e168, 2014.
- MENEGUETTI, D. U. O.; SILVA, F. C.; PELLEZ, D. C.; SOUZA, N. C.; RAMOS, L. J. Adaptation of the technical micronucleus in *Allium cepa*, to future analysis of mutagenicity of the rivers of the Vale do Jamari - Rondônia, Brazil. In Congresso Brasileiro da Sociedade Brasileira de Mutagenese Carcinogênese e Teratogênese Ambiental, São Paulo, **Anais V-Sub-área: Genotoxicidade de contaminantes ambientais e relação gene- ambiente e saúde** (p. 6), São Pedro – SP, 2011.
- MERSCH-SUNDERMANN, V.; KNASMÜLLER, S.; WU, X. J.; DARROUDI, F.; KASSIE, F. Use of a human-derived liver cell line for the detection of cytoprotective, antigenotoxic and cogenotoxic agents. **Toxicology**, v. 198, n. 1, p. 329-340, 2004.

MESTRY, S. N.; GAWALI, N. B.; PAI, S. A.; GURSAHANI, M. S.; DHODI, J. B.; MUNSHI, ; JUVEKAR, A. R. *Punica granatum* improves renal function in gentamicin-induced nephropathy in rats via attenuation of oxidative stress. **Journal of Ayurveda and Integrative Medicine**, 2018.

MEHRZADI, S.; BAHRAMI, N.; MEHRABANI, M.; MOTEVALIAN, M.; MANSOURI, E.; GOUDARZI, M. Ellagic acid: A promising protective remedy against testicular toxicity induced by arsenic. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 103, p. 1464-1472, 2018.

MEHRZADI, S.; FATEMI, I.; MALAYERI, A. R.; KHODADADI, A.; MOHAMMADI, F.; MANSOURI, E.; GOUDARZI, M. Ellagic acid mitigates sodium arsenite-induced renal and hepatic toxicity in male Wistar rats. **Pharmacological Reports**, v. 70, n. 4, p. 712-719, 2018.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Manual de diagnóstico laboratorial da malária. Série A. Normas e Manuais Técnicos. **Ministério da Saúde**, Brasília, 2º ed., 2009.

MOHANDAS N.; CHASIS J.A.; SHOHET S. B. The influence of membrane skeleton on red cell deformability, membrane material properties, and shape. **Seminars in Hematology**, v. 20, n. 3, p. 225–242, 1983.

MORAES, M. M. Ácido Gálico e Ácido Elágico: taninos com propriedades antileishmania e imunomoduladoras. **Dissertação (Mestrado)**, Universidade Federal do Píauí, 65 p. Teresina 2017.

MONTEIRO NETO, M. A. B.; LIMA, I. M. S.; FURTADO, R. A.; BASTOS, J. K.; SILVA FILHO, A. A.; TAVARES, D. C.; SOUZA LIMA, ILDERCÍLIO MOTA. Antigenotoxicity of artemisin C in vivo evaluated by the micronucleus and comet assays. **JAT. Journal of Applied Toxicology**, v. 31, p. 714-719, 2011.

MONEIM, A. E. A.; EL-KHADRAGY, M. F. The potential effects of pomegranate (*Punica granatum*) juice on carbon tetrachloride-induced nephrotoxicity in rats. **Journal of Physiology and Biochemistry**, v. 69, n. 3, p. 359-370, 2013.

MORAIS, V.; SIQUEIRA, W.; MARINHO, M.; MELO, A. Análise toxicológica da água do rio capibaribe da cidade de Toritama-PE. **Blucher Biophysics Proceedings**, v. 1, n. 1, p. 18-19, 2017.

MPHAHLELE, R. R.; FAWOLE, O. A.; STANDER, M. A.; OPARA, U. L. Preharvest and postharvest factors influencing bioactive compounds in pomegranate (*Punica granatum* L.) - A review. **Scientia Horticulturae**, v. 178, p. 114-123, 2014.

NAIR, V.; DAI, Z.; KHAN, M.; CIOLINO, H. P. Pomegranate extract induces cell cycle arrest and alters cellular phenotype of human pancreatic cancer cells. **Anticancer Research**, v. 31, n. 9, p. 2699-2704, 2011.

NASCIMENTO JÚNIOR, B.J.; SANTOS, A.; SOUZA, A.; SANTOS, E.; XAVIER, M.; MENDES, R.; AMORIM, E. Estudo da ação da romã (*Punica granatum* L.) na cicatrização de úlceras induzidas por queimadura em dorso de língua de ratos Wistar (*Rattus norvegicus*). **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 18, n. 2, p. 423-432, 2016.

OLIVEIRA, J. M. G.; PEREIRA, L. J. C.; MOURA, E. R.; SOUSA, M.; SALES, P.; SILVA, ; COSTA, A. Toxicidade subaguda do extrato etanólico das folhas de myracrodruon urundeuva sobre o ciclo estral de ratas wistar. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 18, n. 2, p. 539-546, 2016.

OLIVEIRA, L. M. *Punica granatum*: quantificação de polifenóis de extratos e potencial antifúngico contra *Candida albicans*. **Tese (Doutorado)**, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2016.

PATEL, C.; DADHANIYA, P.; HINGORANI, L.; SONI, M. G. Safety assessment of pomegranate fruit extract: acute and subchronic toxicity studies. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 8, p. 2728-2735, 2008.

PERCÁRIO, S. Prevenção do estresse oxidativo na síndrome de isquemia e reperfusão renal em ratos com suplementação nutricional com antioxidantes. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 2, p. 259-267, 2010.

PEREIRA, S. T. Obtenção e caracterização do extrato seco por *spray drying* de *Punica granatum* para o desenvolvimento de comprimidos mucoadesivos. **Dissertação (Mestrado)**, Universidade Federal do Piauí, Teresina – Piauí, 2015.

PUGAZHENDHI, A.; EDISON, T. N. J. I.; VELMURUGAN, B. K.; JACOB, J. A.; KARUPPUSAMY, I. Toxicity of Doxorubicin (Dox) to different experimental organ systems. **Life Sciences**, v. 200, p. 26-30, 2018.

QUEIROZ, T. B. Q. Estudo do potencial citotóxico e genotóxico do geraniol em células mononucleares do sangue periférico e de hepatocarcinoma humano HepG2. **Dissertação (Mestrado)**, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2017.

RAVIKUMAR, K. V. G.; SUDAKARAN, S. V.; RAVICHANDRAN, K.; PULIMI, M.; NATARAJAN, C.; MUKHERJEE, A. Green synthesis of NiFe nano particles using *Punica granatum* peel extract for tetracycline removal. **Journal of Cleaner Production**, v. 210, p. 767-776, 2019.

RENU, K.; ABILASH, V. G.; PB, T. P.; ARUNACHALAM, S. Molecular mechanism of doxorubicin-induced cardiomyopathy—An update. **European Journal of Pharmacology**, 818, 241-253, 2018.

ROCHETTE, L.; GUENANCIA, C.; GUDJONCIK, A.; HACHET, O.; ZELLER, M.; COTTIN, Y.; VERGELY, C. Anthracyclines/trastuzumab: new aspects of cardiotoxicity and

molecular mechanisms. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 36, n. 6, p. 326-348, 2015.

SAAD, H.; CHARRIER-EL BOUHTOURY, F.; PIZZI, A.; RODE, K.; CHARRIER, B.; AYED, N. Characterization of pomegranate peels tannin extractives. **Industrial Crops and Products**, v. 40, p. 239-246, 2012.

SALGADO, J. M.; FERREIRA, T. R. B.; DE OLIVEIRA BIAZOTTO, F.; DOS SANTOS DIAS, C. T. Increased antioxidant content in juice enriched with dried extract of pomegranate (*Punica granatum*) peel. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 67, n. 1, p. 39-43, 2012.

SÁNCHEZ-LAMAR, A.; FONSECA, G.; FUENTES, J. L.; COZZI, R.; CUNDARI, E.; FIORE, M.; DE SALVIA, R. Assessment of the genotoxic risk of *Punica granatum* L.(Punicaceae) whole fruit extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 115, n. 3, p. 416- 422, 2008.

SAOUD, D. H.; JELASSI, A.; HLILA, M. B.; GOUDJIL, M. B.; LADJEL, S., JANNET, H. B. Biological activities of extracts and metabolites isolated from *Anvillea radiata* Coss. & Dur. (Asteraceae). **South African Journal of Botany**, v. 121, p. 386-393, 2019.

SEPÚLVEDA, L.; DE LA CRUZ, R.; BUENROSTRO, J. J.; ASCACIO-VALDÉS, J. A.; AGUILERA-CARBÓ, A. F.; PRADO, A.; AGUILAR, C. N. Effect of different polyphenol sources on the efficiency of ellagic acid release by *Aspergillus niger*. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 48, n. 1, p. 71-77, 2016.

SERRALVES. *Punica granatum* L. Disponível em: <http://serralves.ubiprism.pt./species/show/1303>>. Acesso em: 06 de julho de 2018.

SGUAREZI, J. G. D.; GONÇALVES, V. F.; ROCHA, T.; MURAKAMI, D. Y.; UZUELLE, M. A.; MOURA, P. R. D. Fitoterápicos na Rede Pública de Saúde (SUS) no Brasil: Um estudo toxicológico de *Mikania glomerata* em fetos de ratas Wistar. **Revista Fitos Eletrônica**, Rio de Janeiro, v. 10, n. 4, p. 375-547, 2017.

SHIBAN, M. S.; AL-OTAIBI, M. M.; AL-ZOREKY, N. S. Antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit peels. **Food and Nutrition Sciences**, v. 3, n. 07, p. 991, 2012.

SILVA, B. T.; DOS ANJOS, C.; NOVO, S. M. F.; MATSUMOTO, L. S.; PEIXOTO, E. C. T. M.; SILVA, L.P.; SILVA, L. P.; SILVA, R. M. G. D. Atividade antimicrobiana in vitro de extrato de *Punica granatum* L. sobre *Staphylococcus aureus* isolado em leite bovino. **Bioscience Journal**, p. 974-984, 2013.

SILVA, D. C. Avaliação do efeito cicatrizante do extrato hidroetanólico e do gel cremoso produzidos à partir das cascas do fruto de *Punica granatum* L. **Dissertação (Mestrado)**,

Fundação Universidade Federal do Amapá, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Macapá, 2017.

SUDHEER, A. R.; MUTHUKUMARAN, S.; DEVIPRIYA, N.; MENON, V. P. Ellagic acid, a natural polyphenol protects rat peripheral blood lymphocytes against nicotine-induced cellular and DNA damage in vitro: with the comparison of N-acetylcysteine. **Toxicology**, v. 230, n. 1, p. 11-21, 2007.

SUDHEESH, S.; SOUMYA, K.; JAMES, J. A novel chalcone derivative from *Punica granatum* peel inhibits LOX/COX enzyme activity. **Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 7, n. 4, p. 593-597, 2018.

SUWALSKY M.; VARGAS P.; AVELLO M.; VILLENA F.; SOTOMAYOR C.F. Human erythrocytes are affected in vitro by flavonoids of *Aristolelia chilensis* (Maqui) leaves. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 363, n. 1-2, p. 85-90, 2008.

TACO. **Tabela Brasileira de Composição de Alimentos**. 4ed. revisada e ampliada. Campinas, SP: UNICAMP, 2011. Disponível em: http://www.nepa.unicamp.br/taco/contar/taco_4_edicao_ampliada_e_revisada.pdf?arquivo=taco_4_versao_ampliada_e_revisada.pdf Acesso em 07 de Julho de 2018.

TAVARES, W. D. S.; MARTIN-PASTOR, M.; TAVARES, A. G.; SOUSA, F. F. Biopharmaceutical Activities Related to Ellagic Acid, Chitosan, and Zein and Their Improvement by Association. **Journal of Food Science**, v. 83, n. 12, p. 2970-2975, 2018.

TEEL, R. W.; CASTONGUAY, A. Antimutagenic Effects of Polyphenolic Compounds. **Cancer Letters**, v. 66, n. 2, p. 107-113, 1992.

TOMASINI, P. P. Análise do óleo essencial de *Piper gaudichaudianum* na citotoxicidade da doxorubicina. **(Doctoral dissertation)** 2018.

VALADARES, M. C.; PEREIRA, E. R. T.; BENFICA, P. L.; PAULA, J. R. Assessment of mutagenic and antimutagenic effects of *Punica granatum* in mice. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 46, n. 1, p. 121-127, 2010.

VARSHNEY, M.; VIJAYAN, V.; MESHRAM, G. P. Chemopreventive effects of ellagic acid against genotoxicity induced by benzo (a) pyrene. **Toxicological & Environmental Chemistry**, v. 97, n. 6, p. 786-798, 2015.

VASCONCELOS, M. C.; BEZERRA, D. P.; FONSECA, A. M.; PEREIRA, M. R. P.; LEMOS, T. L. G.; PESSOA, O. D. L.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; ALVES, A. P. N. N.; COSTA-LOTUFO, L. V. Antitumor activity of Biflorin, an o-Naphthoquinone isolated from *Capraria biflora*. **Biological Pharmaceutical Bulletin**, v. 30, p. 1416-1421, 2007.

VENKATESH, P.; SHANTALA, B.; JAGETIA, G. C.; RAO, K. K.; BALIGA, M. S. Modulation of doxorubicin-induced genotoxicity by *Aegle marmelos* in mouse bone marrow: a micronucleus study. **Integrative Cancer Therapies**, v. 6, n. 1, p. 42-53, 2007.

VIDAL A.; FALLARERO A.; PENA B. R.; MEDINA M. E.; GRA B.; RIVERA F.; VUORELA, P. M. Studies on the toxicity of *Punica granatum* L. (Punicaceae) whole fruit extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 89, n. 2-3, p. 295-300, 2003.

WANG, K. J.; ZHAO, J. L. Corn silk (*Zea mays* L.), a source of natural antioxidants with α -amylase, α -glucosidase, advanced glycation and diabetic nephropathy inhibitory activities. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 110, p. 510-517, 2019.

WATERS, M. D.; BRADY, A. L.; STACK, H. F.; BROCKMAN, H. E. Antimutagenicity profiles for some model compounds. **Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology**, v. 238, n. 1, p. 57-85, 1990.

XU, Y. C.; LIU, X.; LI, M.; LI, Y.; LI, C. Y.; LU, Y.; ZUO, S. B. A Novel mechanism of doxorubicin resistance and tumorigenesis mediated by microRNA-501-5p suppressed BLID. **Molecular Therapy-Nucleic Acids**, v. 12, p. 578-590, 2018.

YANG F.; TEVES S. S.; KEMP C. J.; HENIKOFF S. Doxorubicin, DNA torsion, and chromatin dynamics. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer**, v. 1845, n. 1, p. 84-89, 2014.

YUHONG, G.; TINGTING, D.; JINGXIA, Z.; XIAOLONG, X.; PING, L.; LIJUAN, H.; QINGQUAN, L. Fuxin decoction attenuates doxorubicin-induced heart failure in rats via oxidizing suppression and regulating immune responses. **Journal of Traditional Chinese Medicine**, v. 38, n. 4, p. 579-584, 2018.

ZARGAR, M.; POURAHMAD, J. Protective effect of *Punica granatum* L.(pomegranate) fruit extracts and ellagic acid against cytotoxicity induced by methyl tertiary butyl ether in isolated rat hepatocytes. **Toxicological & Environmental Chemistry**, v. 96, n. 1, p. 150- 161, 2014.

ZENG, G.; ZHANG, M.; WANG, P.; LI, X.; WU, P.; SUN, D. Genotoxicity effects of *Phanerochaete chrysosporium* against harmful algal bloom species by micronucleus test and comet assay. **Chemosphere**, v. 218, p. 1031-1041, 2019.

Anexo 1 – Relação Nacional de plantas medicinais de interesse ao SUS – RENISUS

RENISUS – Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS			
Espécies vegetais			
1	<i>Achillea millefolium</i>	37	<i>Lippia sidoides</i>
2	<i>Allium sativum</i>	38	<i>Malva sylvestris</i>
3	<i>Aloe</i> spp* (<i>A. vera</i> ou <i>A. barbadensis</i>)	39	<i>Maytenus</i> spp* (<i>M. aquifolium</i> ou <i>M. ilicifolia</i>)
4	<i>Alpinia</i> spp* (<i>A. zerumbet</i> ou <i>A. speciosa</i>)	40	<i>Mentha pulegium</i>
5	<i>Anacardium occidentale</i>	41	<i>Mentha</i> spp* (<i>M. crispa</i> , <i>M. piperita</i> ou <i>M. villosa</i>)
6	<i>Ananas comosus</i>	42	<i>Mikania</i> spp* (<i>M. glomerata</i> ou <i>M. laevigata</i>)
7	<i>Apuleia ferrea</i> = <i>Caesalpinia ferrea</i> *	43	<i>Momordica charantia</i>
8	<i>Arrabidaea chica</i>	44	<i>Morus</i> sp*
9	<i>Artemisia absinthium</i>	45	<i>Ocimum gratissimum</i>
10	<i>Baccharis trimera</i>	46	<i>Orbignya speciosa</i>
11	<i>Bauhinia</i> spp* (<i>B. affinis</i> , <i>B. forficata</i> ou <i>B. variegata</i>)	47	<i>Passiflora</i> spp* (<i>P. alata</i> , <i>P. edulis</i> ou <i>P. incarnata</i>)
12	<i>Bidens pilosa</i>	48	<i>Persea</i> spp* (<i>P. gratissima</i> ou <i>P. americana</i>)
13	<i>Calendula officinalis</i>	49	<i>Petroselinum sativum</i>
14	<i>Carapa guianensis</i>	50	<i>Phyllanthus</i> spp* (<i>P. amarus</i> , <i>P. niruri</i> , <i>P. tenellus</i> e <i>P. urinaria</i>)
15	<i>Casearia sylvestris</i>	51	<i>Plantago major</i>
16	<i>Chamomilla recutita</i> = <i>Matricaria chamomilla</i> = <i>Matricaria recutita</i>	52	<i>Plectranthus barbatus</i> = <i>Coleus barbatus</i>
17	<i>Chenopodium ambrosioides</i>	53	<i>Polygonum</i> spp* (<i>P. acre</i> ou <i>P. hydropiperoides</i>)
18	<i>Copaifera</i> spp*	54	<i>Portulaca pilosa</i>
19	<i>Cordia</i> spp* (<i>C. curassavica</i> ou <i>C. verbenacea</i>)*	55	<i>Psidium guajava</i>
20	<i>Costus</i> spp* (<i>C. scaber</i> ou <i>C. spicatus</i>)	56	<i>Punica granatum</i>
21	<i>Croton</i> spp (<i>C. cajucara</i> ou <i>C. zehntneri</i>)	57	<i>Rhamnus purshiana</i>
22	<i>Curcuma longa</i>	58	<i>Ruta graveolens</i>
23	<i>Cynara scolymus</i>	59	<i>Salix alba</i>
24	<i>Dalbergia subcymosa</i>	60	<i>Schinus terebinthifolius</i> = <i>Schinus molle</i>

25	<i>Eleutherine plicata</i>	61	<i>Solanum paniculatum</i>
26	<i>Equisetum arvense</i>	62	<i>Solidago microglossa</i>
27	<i>Erythrina mulungu</i>	63	<i>Stryphnodendron adstringens</i> = <i>Stryphnodendron barbatum</i>
28	<i>Eucalyptus globulus</i>	64	<i>Syzygium</i> spp* (<i>S. jambolanum</i> ou <i>S. cumini</i>)
29	<i>Eugenia uniflora</i> ou <i>Myrtus brasiliensis</i> *	65	<i>Tabebuia avellanedae</i>
30	<i>Foeniculum vulgare</i>	66	<i>Tagetes minuta</i>
31	<i>Glycine max</i>	67	<i>Trifolium pratense</i>
32	<i>Harpagophytum procumbens</i>	68	<i>Uncaria tomentosa</i>
33	<i>Jatropha gossypifolia</i>	69	<i>Vernonia condensata</i>
34	<i>Justicia pectoralis</i>	70	<i>Vernonia</i> spp* (<i>V. ruficoma</i> ou <i>V. polyanthes</i>)
35	<i>Kalanchoe pinnata</i> = <i>Bryophyllum calycinum</i> *	71	<i>Zingiber officinale</i>
36	<i>Lamium album</i>		

* definir a(s) espécie(s) com cultivo, estudos e indicação de uso



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMITE DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA – UNIFAP

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Amapá **APROVOU**, na reunião de 03 de outubro de 2017, o parecer referente ao protocolo no. **0016/2017** e certifica que o Projeto de Pesquisa intitulado **"Avaliação citogenética do extrato hidroalcoólico de *Punica granatum* L. (Romã) e do ácido elágico pelo sistema-teste *in vivo*"** coordenado por **Everton Pantoja Vale**, está de acordo com os princípios de ética e bem estar animal.

CERTIFICATE

The Ethics Committee on Animal Use of the Amapá Federal University **APPROVED** at the meeting of 03 October 2017, the final decision about the Protocol **0016/2017** and certify that the research project entitled **"Avaliação citogenética do extrato hidroalcoólico de *Punica granatum* L. (Romã) e do ácido elágico pelo sistema-teste *in vivo*"** coordinated by **Everton Pantoja Vale**, is in accordance with the principles of ethics and animal welfare.

Macapá, 03 de outubro de 2017.

Prof. Tit. José Carlos Tavares Carvalho
Presidente CEUA-UNIFAP
Port. No. 1733/2014

Anexo 3 – Comprovante de submissão na *Journal of Ethnopharmacology* do Manuscrito: Cytogenetic and toxicological effects of *Punica granatum* Linnaeus fruit peel hidroethanolic extract in mice.

Manuscript Details

Manuscript number	JEP_2019_1333
Title	Cytogenetic and toxicological effects of <i>Punica granatum</i> Linnaeus fruit peel hidroethanolic extract in mice
Article type	Research Paper

Abstract

Ethnopharmacological relevance: *Punica granatum* Linnaeus (Lythraceae), popularly known as "romã", "romeira" and "granada", originated in Asia, is spread throughout the Mediterranean region and also in Brazil. It presents multiple therapeutic properties and has been widely used in folk medicine, food and cosmetics industries. Objectives: To evaluate the antigenotoxic and toxicological effects of the hidroethanolic extract of *Punica granatum* Linnaeus fruit peel (PGFP) orally administered in vivo. Materials and methods: Four different concentrations of PGFP (700, 350, 175 and 87.5 mg/kg of body weight (b.w.)) were administered orally to swiss mice. Negative and positive control groups treated with pure water and doxorubicin (DXR = 15 mg/kg per b.w.), respectively were also used. After 1, 2, 7, 14 and 21 days, samples of peripheral blood were collected and the micronucleus counting evaluated. Subacute toxicity was also assessed during the treatment: body mass, hematological blood components and some organs were histopathologically analysed. Results: In the micronucleus assay, no genotoxic or cytotoxic effects were observed in the different PGFP extract dosis administered. In addition, a potent antigenotoxic effect from damages caused by DXR was observed in these dosis. Likewise, no changes related to the tested extract were observed in the subacute toxicity assay. In contrast, a low toxicity was histopathologically evidenced in spleen, heart and kidneys of PGFP treated mice after a long-term administration. Conclusion: Accordingly, our results showed that the PGFP extracts tested were not genotoxic, cytotoxic and did not alter hematological parameters. Moreover, it has shown a potent antigenotoxic effect and could be considered an important candidate to prevent oxidative damages related to DXR.

Keywords	<i>Punica granatum</i> ; Antigenotoxicity; Micronucleus; Toxicity; Chemoprevention.
Taxonomy	Toxicology, Animal Carcinogenicity Study, Repeat Dose Toxicity Study, In Vivo Toxicology
Corresponding Author	Everton Pantoja Vale
Corresponding Author's Institution	Federal University of Amapá
Order of Authors	Everton Pantoja Vale, Lucas Rodrigues do Rego, Danilo Dheyvison Nascimento Pureza, Paulo Barros Silva, Francisco Sousa, Moacir de Azevedo Bentes Monteiro Neto

Submission Files Included in this PDF

File Name [File Type]

Carta de Apresentação.docx [Cover Letter]

Lista de verificação.pdf [Checklist]

RESUMO GRAFICO 1.tif [Graphical Abstract]

Artigo Traduzido Inglês - Everton v_6.docx [Manuscript File]

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

Cytogenetic and toxicological effects of *Punica granatum* Linnaeus fruit peel hydroethanolic extract in mice

Everton Pantoja Vale^{*a,b}, Lucas Rodrigues do Rego^{a,c}, Danilo Dheyvison Nascimento Pureza^{a,b}, Paulo Goberlanio de Barros Silva^e, Francisco Fábio Oliveira de Sousa^{b,d} and Moacir de Azevedo Bentes Monteiro Neto^{a,b,c}.

Affiliation:

^aGenetic and Biomolecular Research Group (GPCBIO), Department of Biological Sciences and Health, Federal University of Amapá, Rod. Juscelino Kubitscheck, km 02, S / N, Macapá-AP, 68903-419, Brazil.

^bPost-graduate Program in Pharmaceutical Sciences, Department of Biological Sciences and Health, Federal University of Amapá, Rod. Juscelino Kubitscheck, KM 02, S / N, Macapá-AP, 68903-419, Brazil.

^cPost-graduate Program in Health Sciences, Department of Biological Sciences and Health, Federal University of Amapá, Rod. Juscelino Kubitscheck, KM 02, S / N, Macapá- AP, 68903-419, Brazil.

^dLaboratory of Quality Control, Bromatology and Microbiology, Federal University of Amapá, Rod. Juscelino Kubitscheck, KM 02, S / N, Macapá-AP, 68903-419, Brazil.

^eDivision of Oral Pathology, UNICHRISTUS, Rua João Adolfe Gurgel, 133 – Cocó – Fortaleza, 60190-060, Brazil

E-mail address: everton.pantoja.vale@gmail.com, lucasrego.bio@outlook.com, danielodv_nascimento@hotmail.com, paulo_goberlanio@yahoo.com.br, phabio_oliveira@yahoo.com.br, moacir.monteironeto@yahoo.com.br (Respectively)

*Author corresponding: email: everton.pantoja.vale@gmail.com

Abstract

Ethnopharmacological relevance: *Punica granatum* Linnaeus (Lythraceae), popularly known as “romã”, “romeira” and “granada”, originated in Asia, is spread throughout the Mediterranean region and also in Brazil. It presents multiple therapeutic properties and has been widely used in folk medicine, food and cosmetics industries. Objectives: To evaluate the antigenotoxic and toxicological effects of the hydroethanolic extract of *Punica granatum* Linnaeus fruit peel (PGFP) orally administered *in vivo*.

Materials and methods: Four different concentrations of PGFP (700, 350, 175 and 87.5 mg/kg of body weight (b.w.)) were administered orally to swiss mice. Negative and positive control groups treated with pure water and doxorubicin (DXR = 15 mg/kg per b.w.), respectively were also used. After 1, 2, 7, 14 and 21 days, samples of peripheral blood

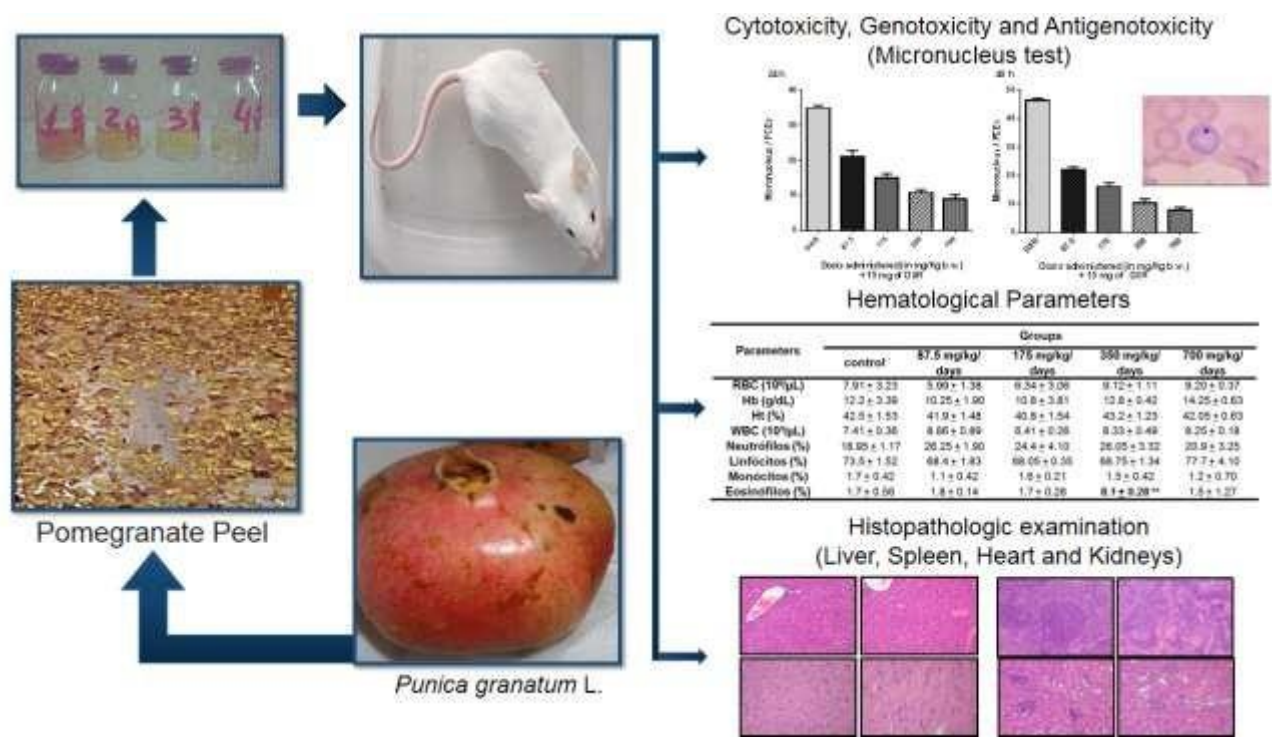
were collected and the micronucleus counting evaluated. Subacute toxicity was also assessed during the treatment: body mass, hematological blood components and some organs were histopathologically were analysed.

Results: In the micronucleus assay, no genotoxic or cytotoxic effects were observed in the different PGFP extract dosis administered. In addition, a potent antigenotoxic effect from damages caused by DRX was observed in these dosis. Likewise, no changes related to the tested extract were observed in the subacute toxicity assay. In contrast, a low toxicity was histopathologically evidenced in spleen, heart and kidneys of PGFP treated mice after a long-term administration.

Conclusion: Accordingly, our results showed that the PGFP extracts tested were not genotoxic, cytotoxic and did not alter hematological parameters. Moreover, it has shown a potent antigenotoxic effect and could be considered an important candidate to prevent oxidative damages related to DXR.

Keywords: *Punica granatum*; Antigenotoxicity; Micronucleus; Toxicity; Chemoprevention.

Graphical abstract



1. Introduction

Medicinal plants provide innumerable resources for therapeutic purposes. Despite the beneficial provided by the extracted bioactives, they are not absent of toxic effects (Braquehais, 2016).

Pomegranate presents several bioactives (Ravikumar et al., 2019). Peel represents 26-30% of the total fruit mass. Several studies have highlighted the biological properties of *Punica granatum* Linnaeus, particularly in the fruit peel, as comparatively to other parts, they are richer in phenolic compounds, such as flavonoids and hydrolysable tannins. It has been studied for a large number of conditions, such as inflammation, infertility (Ismail, Sestili, Akhtar, 2012; Çavdar et al., 2017), anticoccidial (Ahad, Tanveer, Malik, & Nawchoo, 2018), antimicrobial (Elbatanony, El-feky, Hemdan, & El-liethy, 2018), gastroprotection (González-Trujano, 2015), analgesia, antipyretic (Lee, et al., 2010) antioxidant (Elfalleh, et al., 2009; Tavares, et al., 2018) and anticancer activities (Khawairakpam, et al., 2018). Moreover, it has also found important applications in the food and cosmetic industries (Pereira, 2015; Çavdar et al., 2017; Tavares, 2018).

Toxicological experiments shall be able to measure the effects of substances on specific organs, by macroscopic examination, body and organ mass and histopathological examinations (Oliveira et al., 2018). The micronucleus test is used as an index to evaluate genotoxicity in cells after processing, detecting clastogenic, aneugenic and mitotic spindle chromosomal mutations (Villela et al., 2003; Farag; Alagawany, 2018), assessing the exposure to potentially genotoxic substances (Macgregor et al., 1987; Beiruthy and Kazan, 2016).

Doxorubicin (DXR) is an anticancer drug used to treat a wide range of neoplasias, although commonly hazzarduous to multiple untarget organs. While several mechanisms have been suggested, such as intercalation in nuclear and mitochondrial deoxyribonucleic acid DNA, inhibition of topoisomerase II, the role of oxidative stress remains the most accepted mechanism for its genotoxic side effects (Pugazhendhi, 2018; Renu, et al., 2017).

DNA is often exposed to several genotoxic substances, triggering reversible or irreversible damages (Esmolvea; Schumacher, 2014). To minimize such harms, antimutagenic agents are studied to decrease the mutations in the genetic material (Rhee; Park, 2001), contributing to improve the cure rates, preventing and even combating the onset of tumors (Rhee; Park, 2001).

In view of the secondary metabolites present in pomegranate, this study aimed to evaluate the genotoxic, antigenotoxic and toxicological effects of pomegranate peel hydroethanolic extract *in vivo*.

2. Material and methods

2.1. *Punica granatum* fruit peel extract preparation

The fruits of *Punica granatum* Linnaeus were obtained in the Municipality of Almeirim, Brazil. The botanic identification was made at Herbarium Amapaense (HAMAB) at the Institute of Studies and Research of Amapa State (IEPA) under the registration number 18777. Scientific name was indexed using the Plant List (2013) (www.plantlist.org).

After collection, the fruits were washed with running water and soap. The grenades were peeled and fragmented in small pieces (1x1 cm) and immediately submitted to drying in a circulating air oven at 40°C for 72 hours. The dried material was ground in a knife mill (Universal Mill, model 060M007). The obtained fruit peel powder was subjected to maceration (at 20% p/v) for 7 days with 70% ethanol at room temperature (25 °C), with 2 solvent changes followed by filtration in between. The extractive solution was then subjected to concentration at room temperature. The PGFP was conditioned in an amber bottle and preserved at 4°C until the tests.

Based on liquid chromatography tandem mass mass (LC-MS-MS) analysis, PGFP presented 18 compounds, mostly phytocomplexes: ellagic acid, gallic acid and punicalagin (Silva, 2017).

2.2 DNA damage induction

The chemotherapeutic DXR (Rubidox® Smartfarma Ltda., São Paulo, SP) was used as DNA damage inducer in peripheral blood cells (positive control) (De Azevedo Bentes Monteiro Neto et al., 2011; Alves, 2013). The drug was dissolved in distilled water and administered intraperitoneally (0.3 mL / animal). The concentration of DXR (15 mg/kg body weight, b.w.) was established according to the literature (Franke et al., 2005; Venkatesh et al., 2007).

2.3 Animals

Fifty male healthy Swiss mice (6 - 7 weeks and approximately 25 ± 5g body weight) were obtained from the Multidisciplinary Biotherm Center for Biological Research at Animal

Laboratory Science Area (CEMIB) of the State University of Campinas (UNICAMP), Campinas - SP, Brazil. Each experimental group consisted of five animals. The experimental protocols used in this study were in accordance to the legislation for animal experimentation established by the Brazilian National Council of Animal Experimentation (CONCEA). All experimental protocols were reviewed and approved by the Animal Use Ethics Committee (CEUA) of the Federal University of Amapa UNIFAP under the protocol number 016/2017

2.4 Micronucleus test

The genotoxic, antigenotoxic and cytotoxic effects of PGFP were evaluated using the micronucleus test in polychromatic erythrocytes of Swiss mice. PGFP at 87.5; 175; 350 and 700 mg / kg / b.w. was administered orally by gavage for 21 consecutive days, according to the method described by MacGregor et al. (1980).

The animals' tails tip was cut and a blood drop was dripped and dragged over microscopy clean blades and dried at room temperature. Subsequently, they were fixed in absolut methyl alcohol for 5 minutes and again dried at room temperature. After 24 hours, the blades were stained with diluted Giemsa dye (Brazilian Ministry of Health, 2009) for 20 minutes. The blades were then washed to remove the excess of dye, dried at room temperature and examined in an optical microscope (Opton TIM-2008) on the immersion objective (100x).

Micronucleated polychromatic erythrocytes (PCEMNs) in peripheral blood samples were calculated from 2000 cells and the nuclear division index (NDI) was determined as the ratio of polycyclic erythrocytes (PCE) to normochromatic erythrocytes (NCE) (PCE/NCE) based on 400 erythrocytes per slide (Mersch-Sundermann et al., 2004). The reduction in the frequency of PCEMNs was calculated according to the following formula (Waters et al., 1990): % Reduction = $(A-B) / (A-C) \times 100$.

Where A corresponds to the damages from the treatment with DXR (positive control), B is the group treated with PGFP plus DXR, and C is the negative control group.

2.5 Subacute toxicity assay

2.5.1 Body mass follow up

The animals' body mass (in g) was checked daily in a 2 digits electronic scale (maxi house) during the experiment to access the variation between the treatments administered.

2.5.2 Hematological analysis

The blood collected was used for the following hematological tests: hematocrit (Ht), hemoglobin (Hb), erythrocytes, total leukocytes, neutrophils, lymphocytes, monocytes and eosinophils, using an automated cell counter (BC5300, Mindray).

2.5.3 Histopathologic examination of selected organs

For the histological evaluation, the organs (liver, spleen, heart and kidneys) obtained after the mice euthanasia, were carefully analyzed in terms of mass, size, color changes and suggestive lesions. Afterwards, they were fixed in 10% buffered formaldehyde. Finally, they were sectioned, positioned in cassettes and submitted to automated histotechnical processing. Slices of 4 μ m thick were prepared, Hematoxylin- Eosin-stained and assembled in Canada balsam (Junqueira, Junqueira, 1983) for conventional light microscopic analysis.

2.6 Statistical analysis

The data obtained were submitted to analysis of variance (one-way ANOVA), followed by Tukey post-test. The significance level of 5% ($p < 0.05$) has been considered. All results were expressed as mean $\pm$ standard deviation (mean $\pm$ SD). The Graphpad Prism software 7 was used for these analyses.

3 Results

3.1 Micronucleus test

3.1.1 Genotoxicity and antigenotoxicity of PGFP

From the genotoxicity assay, no significant differences ($p > 0.05$) on the micronucleus frequency was observed in polychromatic erythrocytes between PGFP extracts and the negative control group (Table 1), demonstrating total absence of genotoxicity. In contrast, the positive control group treated with DXR increased significantly the micronucleus frequency in comparison to the negative control group. Moreover, when the PGFP extract was associated with DXR, it significantly reduced the micronucleus frequency, demonstrating a potent dose-dependent antigenotoxic effect, with reduction rates of 43.9; 63.6; 77.07 and 82.8% in 24 hours and 56.8; 70.89; 84.5 and 90.6% in 48 hours for the dosis of 87.5, 175, 350 and 700 mg/Kg, respectively (Figure 1), comparatively to the positive control (DXR). The highest concentration 700 mg/Kg has

been able to reduce the genotoxic effect of DXR on the same level as the DXR untreated group after 48h.

3.1.2 Nuclear division index - cytotoxicity

There was no significant differences between the treated animals and control group ($p>0.05$), indicating that PGFP extract at the tested doses did not present cytotoxic effects during the treatment period (from 24 hours to 21 days) (Table 2).

3.2 Subacute toxicity assay

3.2.1 Body mass variation

According to the variation observed between the groups, no significant changes in animals body mass ($p>0.05$) has been observed (Figure 2).

3.2.2 Hematological parameters

No significant changes in the erythrogram (RBC, Ht, Hb) ($p>0.05$) and hematological parameters - Leukogram (Total Leukocytes ($10^3/\mu\text{L}$), Neutrophils (%), Lymphocytes (%) and Monocytes (%)) has been observed among the groups (Table 3). Nonetheless, the group treated with PGFP at the intermediate concentration of 350 mg/kg b.w. presented an atypical increment in the differential eosinophil counting ($p<0.01$) when compared to the negative control group.

3.2.3 Histopathologic examination

In view of the vital organs parameters color, texture, size and anatomical aspect, no macroscopic alterations has been observed. Similarly, no significant differences ($p>0.05$) in the organs mass of the animals treated with the different concentrations of PGFP (Table 4) have been noticed. Some occasional morphological changes have been observed microscopically; both in the PGFP treated and untreated animals. In contrast, some distinct alterations in the animals treated with PGFP were evidenced: in spleen there was some congestion in the red pulp, one of the specimens with megakaryocyte, discrete hemorrhagic focus in the heart, and occasional areas containing tubular and interstitial hemorrhage close to congestive vessels in the kidney. In this context, treatment with PGFP did not induce serious lesions in the organs when compared to the control group, while these alterations can be the result of low toxicity related to a long-term use of PGFP.

4. Discussion

Genotoxicity, antigenotoxicity and toxicity are important parameters to evaluate the safety of popular medicinal plants. Jahromi et al. (2015), observed the absence of toxic signs and symptoms (weight gain and behavioral parameters) during 22 days of experiments with doses remitted (7.5 mg/kg orally) of methanolic pomegranate extract peel. In our experiments, we verified the absence of significant changes in the body mass of animals submitted to dosis between 87.5 and 700 mg/Kg. In view of that, pomegranate peel does not directly alter the body weight *in vivo* in dosis as higher as 700mg/Kg admininstered orally, endorsing the safety of this drug under the experimental conditions used.

No significant growth in the micronucleus frequency in the polychromatic erythrocytes that could determine genotoxicity and/or cytotoxicity of PGFP after daily administrations along 21 days in the dosis assayed was observed.

Vidal et al. (2003) determined the lethal dose 50 - LD₅₀ (731 mg/kg b.w.) of *P. granatum* fruits hydroalcoholic extract administered intraperitoneally in mice. Leaf and fruit extracts of *P. granatum* L. (12.5, 25, 50 and 75 mg/kg) did not induce any cytotoxic effect on the bone marrow cells of mice orally treated for 10 days. Also, no genotoxic effect has been observed under the micronucleus test in mice treated orally with pomegranate aqueous extracts (1000 and 2000 mg / kg b.w.) (De Amorim et al, 1995; Valadares et al., 2010). Contrariwise, the study of Sánchez-Lamar (2008) reported a weak genotoxic effect *in vitro* and *in vivo* at doses of 7, 70, 184, 369 and 700 mg/kg b.w. (intraperitoneally administered) for the whole pomegranate hydroalcoholic extract.

The group treated with DXR administered intraperitoneally increased the micronucleus frequency in polychromatic erythrocytes comparatively to the negative control, evidencing a potential genotoxic effect at the concentration of 15 mg/Kg b.w. In our study, the antigenotoxic dose-dependent effects of PGFP resulted in micronuclei reduction rates (%) up to 90.6% (at 700 mg/Kg dose) after 48 hours. In this case, the damage in the genetic material caused by DXR was minimized to the same levels as the PGFP solely treated animals. Thus, the PGFP can be considered a valuable adjuvant in cancer prevention. This result corroborates with the findings of Valadares et al. (2010), who observed a significant decrease in the frequency of cyclophosphamide-induced micronuclear polymorphic erythrocytes in mice treated orally with different concentrations (12.5, 25, 50 or 75 mg / kg) of *Punica granatum* Linnaeus leaf and fruit ethanolic extracts for 10 days. Another study reported the protective antigenotoxic effect of *P. granatum*

Linnaeus leaf extract (400, 600 and 800 mg / kg b.w., administered orally for 7 days) against DNA damage induced by cyclophosphamide (Dassprakash, 2012). These studies prove the protective effect of different parts of pomegranate against direct or indirect damages to genetic material caused by xenobiotics.

Regarding the blood analysis, no relevant changes in the erythrogram data (RBC, Hb, Ht) and hematological parameters were observed. Nonetheless, the PGFP 350 mg / kg b.w. treated group presented an occasional eosinophilia. As in the highest concentration (700 mg/Kg, b.w.) the eosinophils were within the normal range, this random result shall not be directly related to PGFP. In addition, the administration of PGFP did not cause significant changes in the total leukocyte count, indicating the absence of direct immunosuppressive effects. The study of Patel (2008) indicated no alterations in the clinical and hematological exams in male and female rats orally treated with *Punica granatum* L. pericarp ethanolic extract in doses up to 600 mg/Kg for 90 days. Therefore, our results corroborate with these *in vivo* studies, in which no significant changes in haematological parameters were found.

Sporadic microscopic lesions have been observed in the organs, both in the treated and untreated control groups. In this context, the treatment with PGFP did not induce serious lesions in the organs, while the alterations observed are the result of low toxicity related to the long-term use of PGFP extracts.

Several studies have reported that pomegranate extracts may enhance the antioxidant defense system. Their antioxidant activity may reach up to 92% by reducing free radicals and decreasing oxidative damage in different organs (Elleman et al., 2009; Ismail; Sestili; Akhtar, 2012; Moneim, El-Khadragy, 2013; Tavares, 2018; Wang, And Zhao, 2019). This may explain our findings, as no significant changes in the organs mass or histopathological appreciation were noticed, resulting in little or no toxicity signs.

In summary, our findings showed that PGFP is not genotoxic, cytotoxic and does not alter hematological parameters. Furthermore, it presented a substantial antigenotoxic effect and as such, could be considered an important phytotherapeutic alternative to chemoprevent diseases related to oxidative and DNA damages.

Final considerations

Our findings showed that *Punica granatum* L. fruit peel extract did not cause any significant changes in body mass, hematological, genotoxic and cytotoxic aspects *in vivo*. In the histopathologic appreciation a low toxicity has been noticed in specific organs. Additionally, a substantial antigenotoxic effect reaching up to 90.6% protective effect has

been observed. Therefore, these results may optimize the use of this specie and provide an alternative to prevent DNA damage and minimize the side effects related to chemotherapeutics used in cancer treatment, including DXR.

Acknowledgments

This study was funded in part by the Coordination of Improvement of Higher Level Personnel / Amapá Research Support Foundation (CAPES / FAPEAP), by the CAPES / FAPEAP Grant Program (Public Call 003-2017). We would like to thank the Federal University of Amapá (UNIFAP) and the University Center Unichristus.

Author Contributions

Everton Pantoja Vale designed the study, performed the toxicity, Cytotoxicity, Genotoxicity and Antigenotoxicity assays, and drafted the manuscript. Lucas Rodrigues do Rego assisted in Micronucleus test. Danilo Dheyverson Nascimento Pureza assisted in Micronucleus test. Paulo Goberlanio de Barros Silva performed the histological study and interpreted the data. Francisco F. O. Sousa designed the study, drafted the manuscript, and interpreted the data. Moacir de Azevedo Bentes Monteiro Neto designed the study, drafted the manuscript, and interpreted the data.

References

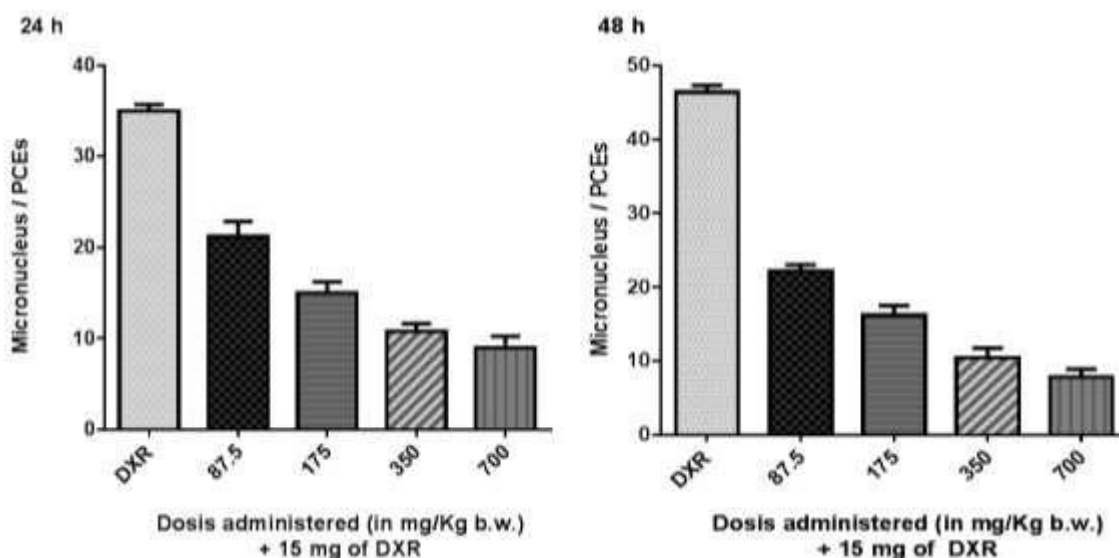
- 1 Ahad, S., Tanveer, S., Malik, T. A., & Nawchoo, I. A., 2018. Anticoccidial activity of fruit peel of *Punica granatum* L. Microbial pathogenesis, 116, 78-83, <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.01.015>
- 2 Alves, J. M., Munari, C. C., De Azevedo Bentes Monteiro Neto, M., Furtado, R. A., Senedese, J. M., Bastos, J. K., & Tavares, D. C., 2013. *In vivo* protective effect of *Copaifera langsdorffii* hydroalcoholic extract on micronuclei induction by doxorubicin. Journal of Applied Toxicology, 33(8), 854-860, <https://doi.org/10.1002/jat.2777>
- 3 Beiruthy, I. W., & Kazan, R. S., 2016. Étude corrélationnelle sur les facteurs prédictifs de la pratique du test de dépistage du cancer du col utérin chez les femmes fréquentant les centres médico-sociaux à Zahlé (Liban). Revue Francophone Internationale de Recherche Infirmière, 2(1), 31-40, <https://doi.org/10.1016/j.refiri.2015.12.003>
- 4 Braquehais, I. D., Vasconcelos, F. R., Ribeiro, A. R. C., da Silva, A. R. A., Franca, M. G. A., de Lima, D. R., & Magalhães, F. E. A., 2016. Estudo preliminar toxicológico, antibacteriano e fitoquímico do extrato etanólico das folhas de *Jatropha mollissima* (Pohl) Baill (pinhão-bravo, Euphorbiaceae), coletada no Município de Tauá, Ceará, Nordeste Brasileiro. Revista Brasileira de Plantas Medicinais, 18(a00101s1), 582-587, https://doi.org/10.1590/1983-084x/15_164

- 5 Çavdar, H. K., Yanık, D. K., Gök, U., & Göğüş, F., 2017. Optimisation of microwave-assisted extraction of pomegranate (*Punica granatum* L.) seed oil and evaluation of its physicochemical and bioactive properties. *Food technology and biotechnology*, 55(1), 86, 10.17113/ftb.55.01.17.4638
- 6 Dassprakash, M. V., Arun, R., Abraham, S. K., & Premkumar, K., 2012. In vitro and in vivo evaluation of antioxidant and antigenotoxic potential of *Punica granatum* leaf extract. *Pharmaceutical biology*, 50(12), 1523-1530, <https://doi.org/10.3109/13880209.2012.689771>
- 7 De Amorim, A., Borba, H. R., & Armada, J. L., 1995. Test of mutagenesis in mice treated with aqueous extracts from *Punica granatum* L. (Pomegranate). *Revista Brasileira de Farmacia*, 76(4), 110-111.
- 8 De Azevedo Bentes Monteiro Neto, M., de Souza Lima, I. M., Furtado, R. A., Bastos, J. K., da Silva Filho, A. A., & Tavares, D. C., 2011. Antigenotoxicity of artepillin C in vivo evaluated by the micronucleus and comet assays. *Journal of Applied Toxicology*, 31(8), 714-719, <https://doi.org/10.1002/jat.1614>
- 9 Elbatanony, M. M., El-Feky, A. M., Hemdan, B. A., & El-Liethy, M. A., 2018. Assessment of the antimicrobial activity of the lipoidal and pigment extracts of *Punica granatum* L. leaves. *Acta Ecologica Sinica*, <https://doi.org/10.1016/j.chnaes.2018.05.003>
- 10 Elfalleh, W., Nasri, N., Marzougui, N., Thabti, I., M'rabet, A., Yahya, Y., ... & Ferchichi, A., 2009. Physico-chemical properties and DPPH-ABTS scavenging activity of some local pomegranate (*Punica granatum*) ecotypes. *International journal of food sciences and nutrition*, 60(sup2), 197-210 <https://doi.org/10.1080/09637480903067037>
- 11 Farag, M. R., & Alagawany, M., 2018. Erythrocytes as a biological model for screening of xenobiotics toxicity. *Chemico-biological interactions*, 279, 73-83, <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2017.11.007>
- 12 Franke, S. I. R., Prá, D., da Silva, J., Erdtmann, B., & Henriques, J. A. P., 2005. Possible repair action of Vitamin C on DNA damage induced by methyl methanesulfonate, cyclophosphamide, FeSO₄ and CuSO₄ in mouse blood cells in vivo. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 583(1), 75-84, <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2005.03.001>
- 13 González-Trujano, M. E., Pellicer, F., Mena, P., Moreno, D. A., & García-Viguera, C., 2015. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of a pomegranate (*Punica granatum* L.) extract rich in ellagitannins. *International journal of food sciences and nutrition*, 66(4), 395-399, <https://doi.org/10.3109/09637486.2015.1024208>
- 14 Ismail, T., Sestili, P., & Akhtar, S., 2012. Pomegranate peel and fruit extracts: a review of potential anti-inflammatory and anti-infective effects. *Journal of ethnopharmacology*, 143(2), 397-405, <https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.07.004>
- 15 Khwairakpam, A. D., Bordoloi, D., Thakur, K. K., Monisha, J., Arfuso, F., Sethi, G., & Kunnumakkara, A. B., 2018. Possible use of *Punica granatum* (Pomegranate) in cancer therapy. *Pharmacological research*, <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2018.04.021>
- 16 Jahromi, S. B., Pourshafie, M. R., Mirabzadeh, E., Tavasoli, A., Katiraei, F., Mostafavi, E., & Abbasian, S., 2015. *Punica granatum* peel extract toxicity in mice. *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products*, 10(4), 10.17795/jjnpp-23770

- 17 Junqueira, L. C. U.; junqueira L. M. M. S., 1983. Técnicas básicas de citologia e histologia. Rio de Janeiro. Ed. Guanabara Koogan.
- 18 Lee, C. J., Chen, L. G., Liang, W. L., & Wang, C. C., 2010. Anti-inflammatory effects of *Punica granatum* Linne invitro and in vivo. Food chemistry, 118(2), 315-322, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.04.123>
- 19 MacGregor, J. T., Heddle, J. A., Hite, M., Margolin, B. H., Ramel, C., Salamone, M. F., & Wild, D., 1987. Guidelines for the conduct of micronucleus assays in mammalian bone marrow erythrocytes. Mutation Research/Genetic Toxicology, 189(2), 103-112, [https://doi.org/10.1016/0165-1218\(87\)90016-4](https://doi.org/10.1016/0165-1218(87)90016-4)
- 20 MacGregor, J. T., Wehr, C. M., & Gould, D. H., 1980. Clastogen-induced micronuclei in peripheral blood erythrocytes: The basis of an improved micronucleus test. Environmental Mutagenesis, 2(4), 509-514, <https://doi.org/10.1002/em.2860020408>
- 21 Mersch-Sundermann, V.; KNASMÜLLER, S.; WU, X. J.; DARROUDI, F.; KASSIE, F., 2004. Use of a human-derived liver cell line for the detection of cytoprotective, antigenotoxic and cogenotoxic agents. Toxicology, v. 198, n. 1, p. 329-340.
- 22 Ministry of Health, 2009. Manual de diagnóstico laboratorial da malária. Série A. Normas e Manuais Técnicos. Ministério da Saúde, Brasília, 2º ed.
- 23 Moneim, A. E. A., & El-Khadragy, M. F., 2013. The potential effects of pomegranate (*Punica granatum*) juice on carbon tetrachloride-induced nephrotoxicity in rats. Journal of physiology and biochemistry, 69(3), 359-370, <https://doi.org/10.1007/s13105-012-0218-3>
- 24 Oliveira, J. M. G., Pereira, L. J. C., Moura, E. R., SOUSA, M., SALES, P., SILVA, S., & COSTA, A., 2018. Toxicidade subaguda do extrato etanólico das folhas de myracrodruon urundeuva sobre o ciclo estral de ratas wistar. Revista Brasileira de Plantas Medicinais, 18(2), 539-546, https://doi.org/10.1590/1983-084X/15_158
- 25 Patel, C., Dadhaniya, P., Hingorani, L., & Soni, M. G., 2008) Safety assessment of pomegranate fruit extract: acute and subchronic toxicity studies. Food and Chemical Toxicology, 46(8), 2728-2735, <https://doi.org/10.1016/j.fct.2008.04.035>
- 26 Pereira, S. T., 2015. Obtenção e caracterização do extrato seco por spray drying de *Punica granatum* para o desenvolvimento de comprimidos mucoadesivos. Dissertação (Mestrado), Programa de pós-graduação em ciências farmacêuticas Universidade Federal do Piauí, Teresina – Piauí.
- 27 Pugazhendhi, A., Edison, T. N. J. I., Velmurugan, B. K., Jacob, J. A., & Karuppusamy, I., 2018. Toxicity of Doxorubicin (Dox) to different experimental organ systems. Life sciences, <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.03.023>
- 28 Ravikumar, K. V. G., Sudakaran, S. V., Ravichandran, K., Pulimi, M., Natarajan, C., & Mukherjee, A., 2019. Green synthesis of NiFe nano particles using Punica granatum peel extract for tetracycline removal. Journal of Cleaner Production, 210, 767-776, <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.11.108>
- 29 Rhee, C. H.; Park, H. D., 2001. Three Glycoproteins with Antimutagenic Activity Identified in Lactobacillus plantarum KLAB21. Applied and Environmental Microbiology, v. 67, n. 8, p. 3445–3449, 1 ago.

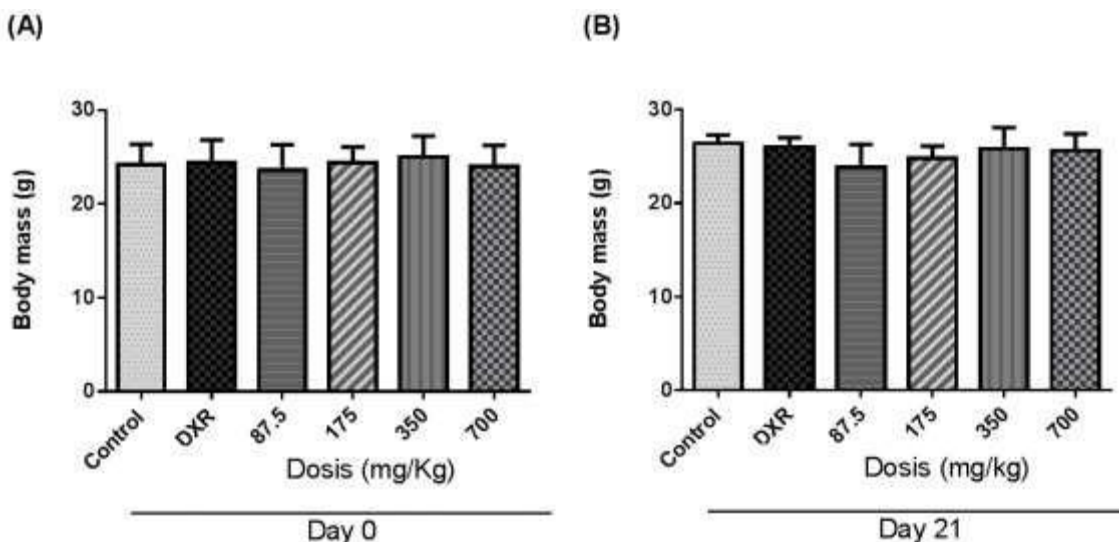
- 30 Renu, K., Abilash, V. G., Pb, T. P., & Arunachalam, S., 2018. Molecular mechanism of doxorubicin-induced cardiomyopathy—An update. *European Journal of pharmacology*, 818, 241-253, <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2017.10.043>
- 31 Sánchez-Lamar, A., Fonseca, G., Fuentes, J. L., Cozzi, R., Cundari, E., Fiore, M., & De Salvia, R., 2008. Assessment of the genotoxic risk of *Punica granatum* L. (Punicaceae) whole fruit extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, 115(3), 416-422, <https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.10.011>
- 32 Silva, D. C., 2017. Avaliação do efeito cicatrizante do extrato hidroetanólico e do gel cremoso produzidos à partir das cascas do fruto de *Punica granatum* L. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas na Universidade Federal do Amapá. Macapá.
- 33 Tavares, W. D. S., Martin-Pastor, M., Tavares, A. G., & Sousa, F. F., 2018. Biopharmaceutical Activities Related to Ellagic Acid, Chitosan, and Zein and Their Improvement by Association. *Journal of food science*, 83(12), 2970-2975, <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14369>
- 34 The Plant List, 2013. Published on the Internet; < <http://www.theplantlist.org/> > (accessed 31 January 2019)
- 35 Valadares, M. C., Pereira, E. R. T., Benfica, P. L., & Paula, J. R., 2010. Assessment of mutagenic and antimutagenic effects of *Punica granatum* in mice. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 46(1), 121-127, <http://dx.doi.org/10.1590/S1984-82502010000100014>
- 36 Venkatesh, P., Shantala, B., Jagetia, G. C., Rao, K. K., & Baliga, M. S., 2007. Modulation of doxorubicin-induced genotoxicity by *Aegle marmelos* in mouse bone marrow: a micronucleus study. *Integrative Cancer Therapies*, 6(1), 42-53, <https://doi.org/10.1177/1534735406298302>
- 37 Vidal, A., Fallarero, A., Peña, B. R., Medina, M. E., Gra, B., Rivera, F., & Vuorela, P. M., 2003. Studies on the toxicity of *Punica granatum* L.(Punicaceae) whole fruit extracts. *Journal of ethnopharmacology*, 89(2-3), 295-300, <https://doi.org/10.1016/j.jep.2003.09.001>
- 38 Villela, I. V., Lau, A., Silveira, J., Prá, D., Rolla, H. C., & Silveira, J. D. D., 2003. Bioensaios para o monitoramento de genotoxicidade ambiental. Silva, J., Erdtmann, B., Henriques, JAP *Genética Toxicológica*. Porto Alegre: Editora Alcance, 145-163.
- 39 Wang, K. J., & Zhao, J. L., 2019. Corn silk (*Zea mays* L.), a source of natural antioxidants with α -amylase, α -glucosidase, advanced glycation and diabetic nephropathy inhibitory activities. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 110, 510-517, <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.11.126>
- 40 Waters, M. D.; Brady, A. L.; Stack, H. F.; Brockman, H. E., 1990. Antimutagenicity profiles for some model compounds. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, v. 238, n. 1, p. 57-85.

Figure 1: Micronucleated polychromatic erythrocytes (PCEMNs) frequency of mice treated with different concentrations of *Punica granatum* Linnaeus hydroethanolic peel extract + doxorubicin (after 24 and 48 hours).



Values were expressed as mean $\pm$ standard deviation. (ANOVA and Tukey's test). h: hours; DXR: Doxorubicin; PCE: Polychromatic erythrocyte.

Figure 2: Mean body mass of animals treated with different concentrations of hydroethanolic extract of *Punica granatum* Linnaeus fruit peel for 21 days, on the Initial Mass - (A) and Final Mass - (B).



Values were expressed as mean $\pm$ standard deviation. (ANOVA and Tukey's test). DXR: Doxorubicin.

Table 1: Frequencies of micronucleated polychromatic erythrocytes (PCEMNs) in peripheral blood of Swiss mice treated with different concentrations of *Punica granatum* Linnaeus hydroethanolic peel extract of and their respective controls.

TREATMENT (mg/kg b. w.)	PCEMNs				
	1 day	2 days	7 days	14 days	21 days
Control	3.6 ± 0.54	3.8 ± 0.83	3.4 ± 1.14	3.6 ± 0.54	3.6 ± 0.89
87.5	4.0 ± 1.22	3.4 ± 1.14	3.4 ± 0.54	3.2 ± 1.30	4.0 ± 0.70
175	4.2 ± 1.30	3.2 ± 0.44	4.0 ± 1.0	3.6 ± 0.89	4.4 ± 0.54
350	3.8 ± 0.83	4.4 ± 0.54	3.0 ± 0.70	4.0 ± 0.70	4.4 ± 1.34
700	5.4 ± 0.89	4.4 ± 1.67	3.6 ± 0.89	4.4 ± 1.34	4.4 ± 0.89

Results are expressed as mean ± standard deviation. (ANOVA and Tukey's test). PCEMNs: Micronucleated polychromatic erythrocyte frequencies.

Table 2: Nuclear division index (NDI) in peripheral blood of mice submitted to different concentrations of *Punica granatum* Linnaeus hydroethanolic peel extracts and / or DXR and their respective controls.

Treatment (mg / kg b. w.)	NDI Mean ± SD				
	1 day	2 days	7 days	14 days	21 days
control	0.03 ± 0.004	0.03 ± 0.02	0.03 ± 0.004	0.03 ± 0.007	0.03 ± 0.01
87.5	0.02 ± 0.006	0.02 ± 0.004	0.02 ± 0.005	0.02 ± 0.004	0.02 ± 0.004
175	0.02 ± 0.007	0.02 ± 0.008	0.02 ± 0.004	0.02 ± 0.003	0.02 ± 0.003
350	0.02 ± 0.009	0.02 ± 0.008	0.02 ± 0.002	0.02 ± 0.008	0.02 ± 0.006
700	0.02 ± 0.005	0.02 ± 0.01	0.03 ± 0.008	0.04 ± 0.006	0.02 ± 0.01
DXR	0.02 ± 0.002	0.02 ± 0.002	-	-	-
87.5 + DXR	0.03 ± 0.006	0.02 ± 0.005	-	-	-
175 + DXR	0.03 ± 0.003	0.02 ± 0.005	-	-	-
350 + DXR	0.03 ± 0.003	0.03 ± 0.004	-	-	-
700 + DXR	0.02 ± 0.0008	0.02 ± 0.005	-	-	-

Values are expressed as mean + standard deviation. (ANOVA and Tukey's test). 400 erythrocytes were analyzed per animal, with a total of 2000 cells per treatment group; NDI: Nuclear division index; DXR: Doxorubicin.

Table 3. Effect of *Punica granatum* Linnaeus hydroethanolic peel extract on hematological parameters and leukogram of Swiss mice.

Parameters	Groups				
	control	87.5 mg/kg/ days	175 mg/kg/ days	350 mg/kg/ days	700 mg/kg/ days
RBC (10 ⁶ /μL)	7.91 ± 3.23	5.99 ± 1.38	6.34 ± 3.06	9.12 ± 1.11	9.20 ± 0.37
Hb (g/dL)	12.2 ± 3.39	10.25 ± 1.90	10.8 ± 3.81	12.8 ± 0.42	14.25 ± 0.63
Ht (%)	42.5 ± 1.53	41.9 ± 1.48	40.8 ± 1.54	43.2 ± 1.23	42.05 ± 0.63
WBC (10 ³ /μL)	7.41 ± 0.36	8.86 ± 0.89	6.41 ± 0.26	8.33 ± 0.49	8.25 ± 0.18
Neutrófilos (%)	18.95 ± 1.17	26.25 ± 1.90	24.4 ± 4.10	26.05 ± 3.32	20.9 ± 3.25
Linfócitos (%)	73.5 ± 1.52	68.4 ± 1.83	68.05 ± 0.35	68.75 ± 1.34	77.7 ± 4.10
Monócitos (%)	1.7 ± 0.42	1.1 ± 0.42	1.6 ± 0.21	1.5 ± 0.42	1.2 ± 0.70
Eosinófilos (%)	1.7 ± 0.56	1.8 ± 0.14	1.7 ± 0.28	8.1 ± 0.28 **	1.5 ± 1.27

Values were expressed as mean ± standard deviation (n = 5). ** ($p < 0.01$) (ANOVA and Tukey's test). RBC (total erythrocytes), Hb (Hemoglobin), Ht (Hematocrit), WBC (Total leukocytes).

Table 4. Effect of *Punica granatum* Linnaeus hydroethanolic peel extract on the organs mass of treated mice and their respective control groups.

Treatment	Dose (mg/kg/ days)	Organs (g / 100 g body mass)				
		Liver	Spleen	Heart	Right Kidney	Left kidney
control	-	3.64 ± 0.42	0.23 ± 0.0004	0.50 ± 0.04	0.82 ± 0.13	0.73 ± 0.07
DXR	15	6.53 ± 0.10 **	0.18 ± 0.01	0.53 ± 0.004	0.63 ± 0.17	0.70 ± 0.06
<i>Punica granatum</i>	87.5	4.46 ± 0.47	0.43 ± 0.33	0.54 ± 0.04	0.71 ± 0.15	0.68 ± 0.11
	175	3.50 ± 0.07	0.20 ± 0.001	0.48 ± 0.06	0.62 ± 0.04	0.70 ± 0.06
	350	4.61 ± 0.65	0.26 ± 0.03	0.52 ± 0.09	0.65 ± 0.11	1.10 ± 0.35
	700	4.58 ± 0.006	0.21 ± 0.002	0.50 ± 0.06	0.64 ± 0.08	0.68 ± 0.16

Values were expressed as mean ± standard deviation. Significant differences between the values were expressed as ** ($p < 0.01$) compared to the control group (negative) (ANOVA and Tukey's test). DXR: Doxorubicin.

Anexo 4 – Manuscrito:

Protective effect of ellagic acid against doxorubicin-induced genotoxicity in polychromatic erythrocytes

Everton Pantoja Vale^{*a,b}, Danilo Dheyvison Nascimento Pureza^{a,b}, Lucas Rodrigues do Rego^{a,c}, Paulo Goberlanio de Barros Silva^e, Francisco Fábio Oliveira de Sousa^{b,d} and Moacir de Azevedo Bentes Monteiro Neto^{a,b,c}.

Affiliation:

^a Genetic and Biomolecular Research Group (GPCBIO), Department of Biological Sciences and Health, Federal University of Amapá, Rod. Juscelino Kubitscheck, km 02, S / N, Macapá-AP, 68903-419, Brazil.

^b Post-graduate Program in Pharmaceutical Sciences, Department of Biological Sciences and Health, Federal University of Amapá, Rod. Juscelino Kubitscheck, KM 02, S / N, Macapá-AP, 68903-419, Brazil.

^c Post-graduate Program in Health Sciences, Department of Biological Sciences and Health, Federal University of Amapá, Rod. Juscelino Kubitscheck, KM 02, S / N, Macapá- AP, 68903-419, Brazil.

^d Laboratory of Quality Control, Bromatology and Microbiology, Federal University of Amapá, Rod. Juscelino Kubitscheck, KM 02, S / N, Macapá-AP, 68903-419, Brazil.

^e Division of Oral Pathology, UNICHRISTUS, Rua João Adolfe Gurgel, 133 – Cocó – Fortaleza, 60190-060, Brazil

E-mail address: everton.pantoja.vale@gmail.com, lucasrego.bio@outlook.com, danilodv_nascimento@hotmail.com, paulo_goberlanio@yahoo.com.br, phabio_oliveira@yahoo.com.br, moacir.monteironeto@yahoo.com.br (Respectively)

*Author corresponding: email: everton.pantoja.vale@gmail.com

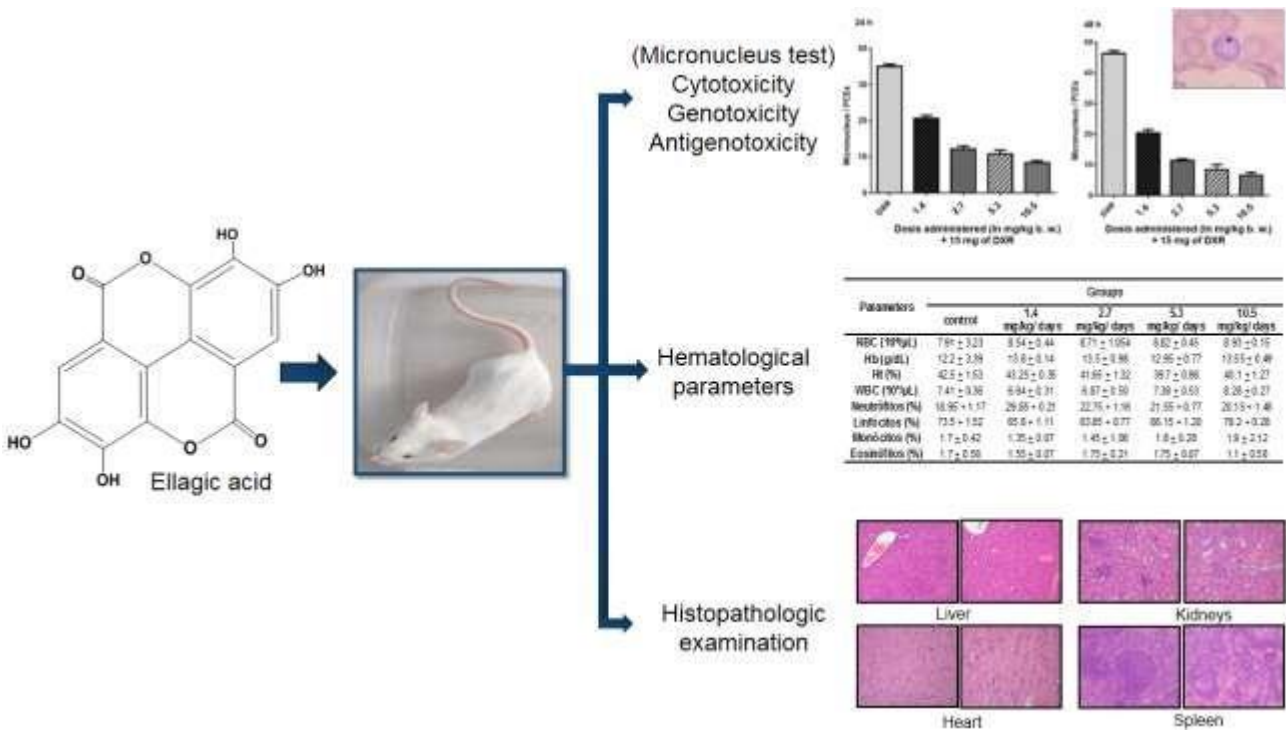
Abstract

Ellagic acid (EA) is a natural phenolic compound found in many fruits and vegetables. It has several biological effects, such as healing, anti-hemorrhagic and high antioxidant effects, the latter with the ability to decrease free radicals and minimize oxidative damage in genetic material caused by anticancer drugs such as doxorubicin. Therefore, this work aimed to evaluate the antigenotoxic and toxicological effects of the EA orally administrated *in vivo*. Four different concentrations of EA (1.4, 2.7, 5.3 and 10.5 mg/kg of body weight - b.w.) were administered orally by gavage to swiss mice. Negative and positive control groups treated with pure water and doxorubicin (DXR = 15 mg/kg per b.w.), respectively were used. After 1, 2, 7, 14 and 21 days, samples of peripheral blood were collected and the micronucleus counting evaluated. Subacute toxicity was also evaluated during the

treatment: where body mass, hematological blood components and some organs were histopathologically were analysed. In the micronucleus assay, no genotoxic or cytotoxic effects were observed in the different EA doses administered. In addition, a potent antigenotoxic effect, protecting the genetic material from damage caused by DRX in all concentrations tested was observed. Likewise, in the subacute toxicity assay, no changes were observed in terms of body mass, relative organs mass and hematological parameters. In contrast, a low toxicity was evidenced in the histological analysis (spleen, heart and kidneys) of EA treated mice after long-term administration. Accordingly, our results showed that EA is not genotoxic, cytotoxic and does not alter hematological parameters. However, it had a potent antigenotoxic effect in doses between 1.4 – 10.5 mg/kg per b.w. and could be considered a potential chemoprotective against the side effects of different substances including doxorubicin, thus improving the quality of life of those who use these substances.

Keywords: Ellagic acid; Micronucleus; Toxicity; Chemoprevention; Antigenotoxicity.

Graphical abstract



Abbreviations:

Ellagic acid (EA), body weight (b.w.), doxorubicin (DXR), reactive oxygen species (ROS), Deoxyribonucleic acid (DNA), Multidisciplinary Biotherm Center for Biological Research at Animal Laboratory Science Area (CEMIB), University of Campinas (UNICAMP), National

Council of Animal Experimentation of Brazil (CONCEA), Animal Use Ethics Committee (CEUA), intraperitoneal injection (i.p.), Micronucleated polychromatic erythrocytes (PCEMNs), Nuclear division index (NDI), Polycyclic erythrocytes (PCE), Normochromatic erythrocytes (NCE), Hematocrit (Ht), hemoglobin (Hb).

Highlights

- Peripheral blood micronucleus test is considered a simple and very informative method, detecting DNA damage *in vivo*.
- Ellagic acid does not cause cytotoxic and genotoxic effects under the conditions evaluated.
- Ellagic acid presented a potent antigenotoxic effect, protecting the DNA against damage induced by doxorubicin.
- Ellagic acid does not alter body mass and hematological parameters under the conditions evaluated.

1. Introduction

The ellagic acid (EA, C₁₄ H₆ O₈), is a natural phenolic compound belonging to the hydrolyzable tannins group, has a flat characteristic containing four hydroxyl groups and two lactone groups present in several plant foods, mainly fruits such as nuts, strawberries, raspberry, grapes and blackberries and on medicinal plants. The same may be present in the part of the membrane structure and plant cell wall in free form or forming large complexes of EA with glucose called elagitannins. (González-Sarrías, et al., 2015, Zhou, et al., 2019).

Its physiological functions go beyond the well-being of the plant itself, allowing several biological effects for the human organism, such as healing effects (Al-obaidi, et al., 2014), anti-hemorrhagic (Gopalakrishnan, et al., 2014), bacteriostatic and bactericidal activity against *S. aureus* and *P. aeruginosa* and a high antioxidant activity (Tavares, et al., 2018).

These effects may be related to the antioxidant capacity that this compound performs, either by the mechanism of free radical sequestration or by the chelation of metallic ions (Larrosa, et al., 2010). In this way, can act against oxidative stress, being one of the main responsible for causing oxidative damages in the organismo, besides acting indirectly in the activation of cell antioxidante enzymatic systems (Mehrzadi et al., 2018).

In this way, oxidative stress arises from the imbalance between the production of reactive oxygen species (ROS), which can cause serious damage to proteins, lipids,

genetic material and even result in cell death. Thus, free radicals excess are considered a danger to human health, and can trigger numerous cardiovascular, kidney and cancer diseases (Wang, Zhao, 2019). For this reason, the effects produced by EA in the prevention of oxidation-related diseases have been extensively studied.

Phenolics have a characteristic of binding to the genetic material at the site that normally would occur the reaction between the active metabolites of the carcinogen and the deoxyribonucleic acid (DNA), forming a carcinogen - DNA link, a crucial step for the onset of carcinogenesis (Bhattacharya; Firozi, 1988, Dixit, Gold, 1986, Khanduja, Majid, 1993). These substances are classified as demutagenic, acting as protection against mutagenic substances before acting on DNA and bio-antimutagenic substances that act on metabolic processes of repair (Rhee, Park, 2001).

Although several studies have focused on different biological activities of EA, little focus has been given to the effects on genetic material. It is known that EA can induce apoptosis and inhibit the proliferation of many types of cancer cells *in vitro* and *in vivo*. (Boehning, et al., 2018).

Accordingly, EA has attracted a significant interest as a potential chemotherapeutic compound, which can provide a better quality of life for human health, also, studies focused on this substance, contributes to increase knowledge about the true effects of EA in the body. In this context, the present study aimed to evaluate the genotoxic, antigenotoxic and toxicological effects of ellagic acid *in vivo*.

2. Material and methods

2.1. Chemicals

Ellagic acid (purity $\geq$ 95%) was purchased from Sigma-aldrich® (Saint Louis, Missouri, USA). The chemotherapeutic doxorubicin (DXR) (Rubidox® Smartfarma Ltda., São Paulo, SP).

2.2 Animals and treatment

Fifty male healthy Swiss mice (6-7 weeks and approximately 25 g $\pm$ 5 body weight) were obtained from the Multidisciplinary Biotherm Center for Biological Research at Animal Laboratory Science Area (CEMIB) of the State University of Campinas (UNICAMP), Campinas - SP, Brazil. Were stored in plastic boxes in an experimental room under controlled conditions of temperature (23 $\pm$ 2 °C), humidity (50 $\pm$ 10%), 12 - hour cycle bright-dark, with access ad libitum to feed and water. in an experimental room under

controlled conditions of temperature (23 ± 2 °C), humidity ($50 \pm 10\%$), 12 - hour cycle bright-dark, with access *ad libitum* to feed and water. The experimental protocols reported in this study were performed according to the legislation for animal experimentation established by the Brazilian National Council of Animal Experimentation (CONCEA). All experimental protocols were reviewed and approved by the Animal Use Ethics Committee (CEUA) of the Federal University of Amapa UNIFAP under the protocol number 016/2017.

The animals were randomly divided into ten groups ($n = 5$). The doses of EA (1.4, 2.7, 5.3 and 10.5 mg / kg) and DXR (15 mg / kg b.w.) were chosen based on previous studies. EA was administered by gavage (0.5 ml) for 21 consecutive days at 24 hours intervals, while DXR was given with an intraperitoneal injection (i.p.) at day 20 to assess the antigenotoxic effects of EA.

2.3 Micronucleus test

The micronucleus test was performed according to the method described by MacGregor et al. (1980) with modifications:

The animals' tails tip was cut and a blood drop was dripped and dragged over clean blades, whose were left drying at room temperature. Immediately after drying they were fixed in methyl alcohol PA for 5 minutes and again dried at room temperature. After 24 hours, the blades were stained with diluted Giemsa dye (Ministry of Health, 2009) for 20 minutes. The blades were then washed to remove the excess of dye, dried at room temperature and read in an optical microscope (Opton TIM-2008) on the immersion objective (100x).

Micronucleated polychromatic erythrocytes (PCEMNs) in peripheral blood samples were calculated from 2000 cells and the nuclear division index (NDI) was determined as the ratio of polycyclic erythrocytes (PCE) to normochromatic erythrocytes (NCE) (PCE/NCE) based on 400 erythrocytes per animal (Mersch-Sundermann et al., 2004). The reduction in the frequency of PCEMNs was calculated according to the following formula, Waters et al. (1990): % Reduction = $(A-B) / (A-C) \times 100$.

At where A was the group treated with DXR (Positive Control), B the group treated with ellagic acid + DXR and C was the group treated with water (Negative Control).

2.4 Subacute toxicity assay

2.4.1 Body mass of animals

The animals were checked daily during the experiment to evaluate the resulting body mass (in g) variation and compared between the treatments received.

2.4.2 Hematological analysis

The blood collected from the mice was used to perform the following hematological tests: Hematocrit (Ht), hemoglobin (Hb), erythrocytes, total leukocytes, neutrophils, lymphocytes, monocytes and eosinophils. An automated cell counter has been used during the analysis (BC5300, Mindray).

2.4.3 Histopathology of selected organs

For the histological evaluation, the following organs (liver, spleen, heart and kidneys) obtained after the mice euthanasia were collected and analyzed for lesion signs, size and color changes. The mass of these organs was also measured. After weighed, the organs were fixed in 10% buffered formaldehyde. Afterwards, they were sectioned, placed in cassettes and submitted to automated histotechnical processing. Slices of 4 µm thick were prepared, Hematoxylin-Eosin-stained and assembled in Canada balsam (Junqueira, Junqueira, 1983) for conventional light microscopic analysis.

2.5 Statistical analysis

The results obtained in the various analyzes are expressed as mean $\pm$ standard deviation of the mean of each experimental group. The analysis of variance (ANOVA) was used to compare the data of the groups evaluated, followed by the Tukey test, with significance of 5% ($p < 0.05$). The Graphpad Prism® software 7 was used for the statistical analysis.

3 Results

3.1 Micronucleus test

3.1.1 Genotoxicity and antigenotoxicity of EA

From the genotoxicity assay, the positive control group treated with DXR induced a significant increase in the micronucleus frequency on polychromatic erythrocytes comparatively to the negative control group. Treatment with EA given by gavage for 21 days consecutives, 24-hour intervals did not show a significant difference ($p > 0.05$) in micronucleus frequency compared to negative control at different periods (1, 2, 7, 14 and

21 days), demonstrating absence of genotoxicity (Table 1). However, when the EA was associated with DXR it significantly reduced the frequency of micronucleus on polychromatic erythrocytes, demonstrating a potent dose-dependent antigenotoxic effect of the EA, with a reduction rate of 45.86; 72.6; 77.07 and 84.7% in 24 hours and 61; 82.1; 89.2 and 93.4% in 48 hours respectively (Figure 1), when compared to the positive control (DXR). The highest concentration 10.5 mg/Kg has been able to reduce the genotoxic effect of DXR on the same level as the untreated group after 48h.

3.1.2 Nuclear division index - cytotoxicity

The analysis of the nuclear division index (NDI), there was no significant differences between the treatment groups compared to the control group ($p>0.05$), indicating that EA at the tested doses did not present cytotoxic effects during the treatment period (from 24 hours to 21 days) (Table 2).

3.2 Subacute toxicity assay

3.2.1 Body mass of animals

The analysis of body mass in this study was performed daily to verify possible weight changes (gain or loss of body mass) in mice treated with different concentrations of EA. According to the variation observed between the groups, no significant changes in the body mass (g) of the animals ($p>0.05$) has been observed (Figure 2).

3.2.2 Hematological parameters

No significant changes in the erythrogram (RBC, Ht, Hb) ($p>0.05$) and hematological parameters - Leukogram (Total Leukocytes ($10^3/\mu\text{L}$), Neutrophils (%), Lymphocytes (%), Monocytes (%) and Eosinophils (%)) (Table 3).

3.2.3 Histopathologic examination

Considering the parameters color, texture, size and shape, no macroscopic alterations on the vital organs has been observed. Nonetheless, a significant alteration of the relative liver mass was observed with the use of EA at a concentration of 5.3 mg / kg, b.w. ($p<0.05$) compared to the control group, Table 4. In the histopathological parameters, some occasional morphological changes have been observed microscopically; both in the EA treated and untreated animals. In contrast, some distinct alterations in the animals treated with EA were evidenced: in spleen the white pulp was hyperplastic and sometimes

disorganized discrete hemorrhagic focus in the heart, in the kidneys slight swelling of the epithelium tubular areas with hyaline cylinder areas, sections of tubular and interstitial hemorrhage in most cases and congestive vessels in the vicinity of areas of hemorrhage. In this context, treatment with EA did not induce serious lesions in the organs when compared to the control group, while these alterations can be the result of low toxicity related to the long-term use of EA.

4. Discussion

According to Teel and Castonguay (1992), EA is absorbed rapidly by the gastrointestinal system (15 minutes) after oral administration of the same. In this study, the administration of EA was for 21 consecutive days at 24-hour intervals, thus causing an optimal absorption. In this way, we try to value the way society uses these products, since this substance is present in various foods and different natural products. In this context, we can assume that the use of this substance is considered safe for the use, mainly of some products natural that have in their constitution the EA, thus not changing the body weight.

Studies have already been reported to evaluate the cytogenetic effect of EA. Grossi, et al. (2014), found that EA (50 and 100 mg / kg b.w.) alone had no effect on MNPCs, PCs / NCEs and % PCs, during five days of treatment, compared to control. In this study, the micronucleus test there was no evidence of an increase in the micronucleus frequency in polychromatic erythrocytes, stating that the EA has no genotoxic effect under the conditions employed. In addition, the NDI analysis, no changes in cell proliferation were observed, demonstrating the absence of cytotoxic effect according to the treatment protocols used in the study. The cytotoxicity of a substance is directly proportional to its concentrations and route of administration, besides the time of exposure of the individual (Macgregor, et al., 1987; Kumar et al., 2009). One factor that may have contributed to this fact is the antioxidant effects that EA presents against different substances (Tavares, et al., 2018).

However, treatment with DXR showed a significant increase in the frequency of micronuclei in polychromatic cells in peripheral blood in relation to the negative control group, demonstrating a potential genotoxic effect of this substance. These results corroborate with the study conducted by Carneiro, et al. (2017) which demonstrated DNA damage caused by DXR in polychromatic erythrocytes of Swiss mice using the concentration of 15 mg / kg b.w. In this context, many mechanisms are suggested for DXR, such as inhibition of protein synthesis and DNA replication by the ability to

intercalate with DNA, however, oxidative stress is the main mechanism of this substance, thus causing damage to genetic material (Minotti et al., 2004).

Several studies report the protective effects of EA against different substances that cause damage to the body, including DXR. Sudheer, et al. (2007) found an increase in the frequency of micronucleus in lymphocytes treated with nicotine, but the same study demonstrates that the simultaneous treatment with EA significantly reduces the micronucleus frequency, thus playing a protective effect against nicotine toxicity. In the study by Varshney; Vijayan; Meshram (2015), there was a reduction in the mean number of micronucleated polychromatic erythrocytes in the presence of EA (10 mg / kg b.w.), thus demonstrating the antimutagenic role played by EA against the mutagenic activity of Benzo and Pyrene in systems *in vitro* and *in vivo*.

These results corroborate our study, at where we demonstrated the potential antimutagenic effect of the use of EA associated with DXR at all doses tested, with a significant (%) reduction in the frequencies of micronuclei in polychromatic erythrocytes of up to 93.4% in 48 hours, when compared to the positive control. We observed that the antigenotoxic effect of EA was considered dose dependent, increasing the rate of reduction (%) according to dose and time of exposure, thus playing an important role in the chemoprevention of anticancer drugs and other xenobiotics that cause damage direct or indirect genetic material, including DXR.

The possible reason for the antigenotoxic behavior of EA can be related to its antioxidant effects (Tavares, et al., 2018), thus reducing damages to the cellular structure and genetic material caused by substances of both origin natural and synthetic. A study by Kilic, Yeşiloğlu and Bayrak (2014), concluded that EA has an antioxyd activity, inhibiting 71.2% of lipid peroxidation. According to Firdaus et al. (2018) demonstrated that pre and co-administration of EA at doses of 20 and 40 mg / kg causes a marked reduction in the total production of reactive oxygen species in a dose dependent manner and is considered a promising therapeutic candidate against neurotoxicity.

Regarding the blood analysis, no relevant changes in the erythrogram data (RBC, Hb, Ht) and hematological parameters *in vivo*. Based on the results obtained in this study, we can assume that the use of EA at the concentration used is safe.

An important requirement in toxicological experiments is the ability to measure the effects of substances on specific organs (Oliveira, et al., 2018). Our study, we observed a significant alteration of relative liver mass with the use of EA at a concentration of 5.3 mg / kg b.w., compared to control group, which may be related to the susceptibility of the liver to

post-substance lesions, which is the site of metabolization, concentration and biotransformation of these substances (Bischoff, Mukai and Ramaiah, 2018).

In addition, sporadic occurrence of lesions have been observed in the organs, both in the treated and untreated control groups. In this context, the treatment with EA did not induce serious lesions in the organs, while the alterations observed are the result of low toxicity related to the continuous use. Thus, lipid peroxidation is the main means of altering the functions and structure of the plasma membrane of a cell, generally resulting in cell death (Percario, 2010). This may explain our findings, as no significant changes in the or histopathological appreciation were noticed, resulting in little or no toxicity in comparasion to the control group.

The antioxidant effects that EA presents may have caused the decrease of these oxidative damages in the cells of the body. This may explain the poor toxicity of ellagic acid in the organs. In summary, our results showed that EA is not genotoxic, cytotoxic and does not alter hematological parameters. Adittionaly, it presented a substantial antigenotoxic effect and as such, could be considered an important alternative to chemoprevent diseases related to oxidative and DNA damages.

Final considerations

Our findings show that the EA did not cause any significant changes in body mass, hematological, genotoxic and cytotoxic aspects *in vivo*. In the histopathologic appreciation a low toxicity has been noticed in specific organs. Additionally, in the doses studied presented a substantial antigenotoxic effect reaching up to 93.4% protective effect. Therefore, these results may optimize the use of EA and provide an alternative to prevent the DNA damage and minimize the side effects caused by various chemotherapeutics, including DXR.

Acknowledgments

This study was funded in part by the Coordination of Improvement of Higher Level Personnel / Amapá Research Support Foundation (CAPES / FAPEAP), by the CAPES / FAPEAP Grant Program (Public Call 003-2017). We would like to thank the Federal University of Amapá (UNIFAP) and the University Center Unichristus.

Author Contributions

Everton Pantoja Vale designed the study, performed the toxicity, Cytotoxicity, Genotoxicity and Antigenotoxicity assays, and drafted the manuscript. Lucas Rodrigues do

Rego assisted in Micronucleus test. Danilo Dheyvison Nascimento Pureza assisted in Micronucleus test. Paulo Goberlanio de Barros Silva performed the histological study and interpreted the data. Francisco F. O. Sousa designed the study, drafted the manuscript, and interpreted the data. Moacir de Azevedo Bentes Monteiro Neto designed the study, drafted the manuscript, and interpreted the data.

References

- Al-Obaidi, M. M. J., Al-Bayaty, F. H., Al Batran, R., Hassandarvish, P., & Rouhollahi, E. (2014). Protective effect of ellagic acid on healing alveolar bone after tooth extraction in rat—a histological and immunohistochemical study. *Archives of oral biology*, 59(9), 987- 999. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2014.06.001>
- Bhattacharya, R. K., & Firozi, P. F. (1988). Effect of plant flavonoids on microsome catalyzed reactions of aflatoxin B1 leading to activation and DNA adduct formation. *Cancer letters*, 39(1), 85-91, [https://doi.org/10.1016/0304-3835\(88\)90043-2](https://doi.org/10.1016/0304-3835(88)90043-2)
- Bischoff, K., Mukai, M., & Ramaiah, S. K. (2018). Liver toxicity. In *Veterinary toxicology*. (Third Edition), (pp. 239-257). Academic Press, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811410-0.00015-5>
- Boehning, A. L., Essien, S. A., Underwood, E. L., Dash, P. K., & Boehning, D. (2018). Cell type-dependent effects of ellagic acid on cellular metabolism. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 106, 411-418, <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.06.142>
- Carneiro, A. B. A., Pinto, E. J. S., Ribeiro, I. F., Magalhães, M. R. G., & Monteiro, M. D. A. B. (2017). Efeito da *Astrocaryum aculeatum* (Tucumã) na toxicidade da Doxorubicina: modelo experimental in vivo. *Acta Paulista de Enfermagem*, 30(3), 233-239, <http://dx.doi.org/10.1590/1982-0194201700036>
- Dixit, R., & Gold, B. (1986). Inhibition of N-methyl-N-nitrosourea-induced mutagenicity and DNA methylation by ellagic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83(21), 8039-8043, <https://doi.org/10.1073/pnas.83.21.8039>
- Firdaus, F., Zafeer, M. F., Anis, E., Ahmad, M., & Afzal, M. (2018). Ellagic acid attenuates arsenic induced neuro-inflammation and mitochondrial dysfunction associated apoptosis. *Toxicology reports*, 5, 411-417, <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2018.02.017>
- Gopalakrishnan, L., Ramana, L. N., Sethuraman, S., & Krishnan, U. M. (2014). Ellagic acid encapsulated chitosan nanoparticles as anti-hemorrhagic agent. *Carbohydrate polymers*, 111, 215-221, <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.03.093>
- González-Sarriás, A., García-Villalba, R., Núñez-Sánchez, M. Á., Tomé-Carneiro, J., Zafrilla, P., Mulero, J., & Espín, J. C. (2015). Identifying the limits for ellagic acid bioavailability: A crossover pharmacokinetic study in healthy volunteers after consumption of pomegranate extracts. *Journal of Functional Foods*, 19, 225-235, <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.09.019>
- Grossi, M. R., Berni, A., Pepe, G., Filippi, S., Meschini, R., Papeschi, C., & Palitti, F. (2014). Evaluation of the effects of ellagic acid (EA) on 7, 12-dimethylbenz (α) anthracene

- (DMBA) induced micronuclei in mammalian cells in vitro and in vivo. *Toxicology letters*, 224(2), 240-245, <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2013.10.012>
- Junqueira, L. C. U.; Junqueira L. M. M. S. (1983). *Técnicas básicas de citologia e histologia*. Rio de Janeiro. Ed. Guanabara Koogan.
- Khanduja, K. L., & Majid, S. (1993). Ellagic acid inhibits DNA binding of benzo (a) pyrene activated by different modes. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 15(1), 1-9, <https://doi.org/10.3164/jcbn.15.1>
- Kilic, I., Yeşiloğlu, Y., & Bayrak, Y. (2014). Spectroscopic studies on the antioxidant activity of ellagic acid. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 130, 447-452, <https://doi.org/10.1016/j.saa.2014.04.052>
- Kumar, M. R. S., Aithal, K., Rao, B. N., Udupa, N., & Rao, B. S. S. (2009). Cytotoxic, genotoxic and oxidative stress induced by 1, 4-naphthoquinone in B16F1 melanoma tumor cells. *Toxicology in Vitro*, 23(2), 242-250, <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2008.12.004>
- Larrosa, M., García-Conesa, M. T., Espín, J. C., & Tomás-Barberán, F. A. (2010). Ellagitannins, ellagic acid and vascular health. *Molecular aspects of medicine*, 31(6), 513-539, <https://doi.org/10.1016/j.mam.2010.09.005>
- MacGregor, J. T., Wehr, C. M., & Gould, D. H. (1980). Clastogen-induced micronuclei in peripheral blood erythrocytes: The basis of an improved micronucleus test. *Environmental Mutagenesis*, 2(4), 509-514, <https://doi.org/10.1002/em.2860020408>
- MacGregor, J. T., Heddle, J. A., Hite, M., Margolin, B. H., Ramel, C., Salamone, M. F., & Wild, D. (1987). Guidelines for the conduct of micronucleus assays in mammalian bone marrow erythrocytes. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 189(2), 103-112, [https://doi.org/10.1016/0165-1218\(87\)90016-4](https://doi.org/10.1016/0165-1218(87)90016-4)
- Mersch-Sundermann, V., Knasmüller, S., Wu, X. J., Darroudi, F., & Kassie, F. (2004). Use of a human-derived liver cell line for the detection of cytoprotective, antigenotoxic and cogenotoxic agents. *Toxicology*, 198(1-3), 329-34, <https://doi.org/10.1016/j.tox.2004.02.009>
- Mehrzadi, S., Fatemi, I., Malayeri, A. R., Khodadadi, A., Mohammadi, F., Mansouri, E., ... & Goudarzi, M. (2018). Ellagic acid mitigates sodium arsenite-induced renal and hepatic toxicity in male Wistar rats. *Pharmacological Reports*, 70(4), 712-719, <https://doi.org/10.1016/j.pharep.2018.02.007>
- Ministério da Saúde (2009). *Manual de diagnóstico laboratorial da malária. Série A. Normas e Manuais Técnicos*. Ministério da Saúde, Brasília, 2º ed.
- Minotti, G., Menna, P., Salvatorelli, E., Cairo, G., & Gianni, L. (2004). Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacological reviews*, 56(2), 185-229. doi: <https://doi.org/10.1124/pr.56.2.6>
- Oliveira, J. M. G., Pereira, L. J. C., Moura, E. R., SOUSA, M., SALES, P., SILVA, S., ... & COSTA, A. (2018). Toxicidade subaguda do extrato etanólico das folhas de myracrodruon urundeuva sobre o ciclo estral de ratas wistar. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 18(2), 539-546, https://doi.org/10.1590/1983-084X/15_158

Rhee, C. H., & Park, H. D. (2001). Three glycoproteins with antimutagenic activity identified in *Lactobacillus plantarum* KLAB21. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67(8), 3445-3449. doi: 10.1128 / AEM.67.8.3445-3449.2001

Sudheer, A. R., Muthukumaran, S., Devipriya, N., & Menon, V. P. (2007). Ellagic acid, a natural polyphenol protects rat peripheral blood lymphocytes against nicotine-induced cellular and DNA damage in vitro: with the comparison of N-acetylcysteine. *Toxicology*, 230(1), 11-21, <https://doi.org/10.1016/j.tox.2006.10.010>

Tavares, W. D. S., Martin-Pastor, M., Tavares, A. G., & Sousa, F. F. (2018). Biopharmaceutical Activities Related to Ellagic Acid, Chitosan, and Zein and Their Improvement by Association. *Journal of food science*, 83(12), 2970-2975, <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14369>

Teel, R. W., & Castonguay, A. (1992). Antimutagenic effects of polyphenolic compounds. *Cancer letters*, 66(2), 107-113, [https://doi.org/10.1016/0304-3835\(92\)90222-H](https://doi.org/10.1016/0304-3835(92)90222-H)

Varshney, M., Vijayan, V., & Meshram, G. P. (2015). Chemopreventive effects of ellagic acid against genotoxicity induced by benzo (a) pyrene. *Toxicological & Environmental Chemistry*, 97(6), 786-798, <https://doi.org/10.1080/02772248.2015.1063253>

Wang, K. J., & Zhao, J. L. (2019). Corn silk (*Zea mays* L.), a source of natural antioxidants with α -amylase, α -glucosidase, advanced glycation and diabetic nephropathy inhibitory activities. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 110, 510-517, <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.11.126>

Waters, M. D., Brady, A. L., Stack, H. F., & Brockman, H. E. (1990). Antimutagenicity profiles for some model compounds. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, 238(1), 57-85. [https://doi.org/10.1016/0165-1110\(90\)90039-E](https://doi.org/10.1016/0165-1110(90)90039-E)

Zhou, B., Li, Q., Wang, J., Chen, P., & Jiang, S. (2019). Ellagic acid attenuates streptozocin induced diabetic nephropathy via the regulation of oxidative stress and inflammatory signaling. *Food and Chemical Toxicology*, 123, 16-27, <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.10.036>

Figure 1: Micronucleated polychromatic erythrocyte (PCEMNs) frequency of mice treated with different concentrations of ellagic acid + doxorubbcin (after 24 and 48 hours). Values were expressed as mean $\pm$ standard deviation. (ANOVA and Tukey's test). h: hours; DXR: Doxorubicin; PCE: Polychromatic erythrocyte.

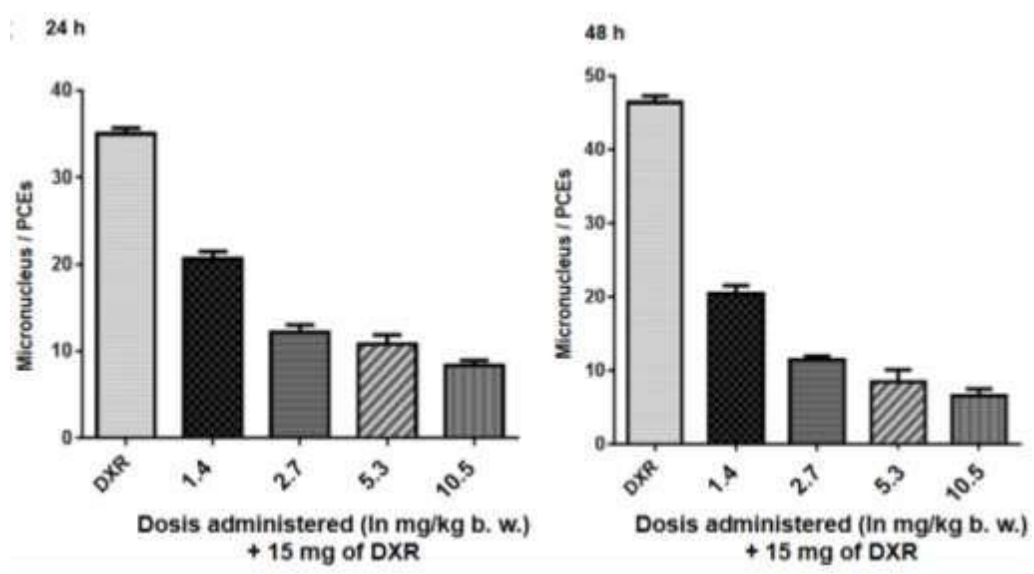


Figure 2: Mean body mass of animals treated with different concentrations of ellagic acid for 21 days, on the Initial Mass - (A) and Final Mass - (B). Values were expressed as mean $\pm$ standard deviation. (ANOVA and Tukey's test). DXR: Doxorubicin.

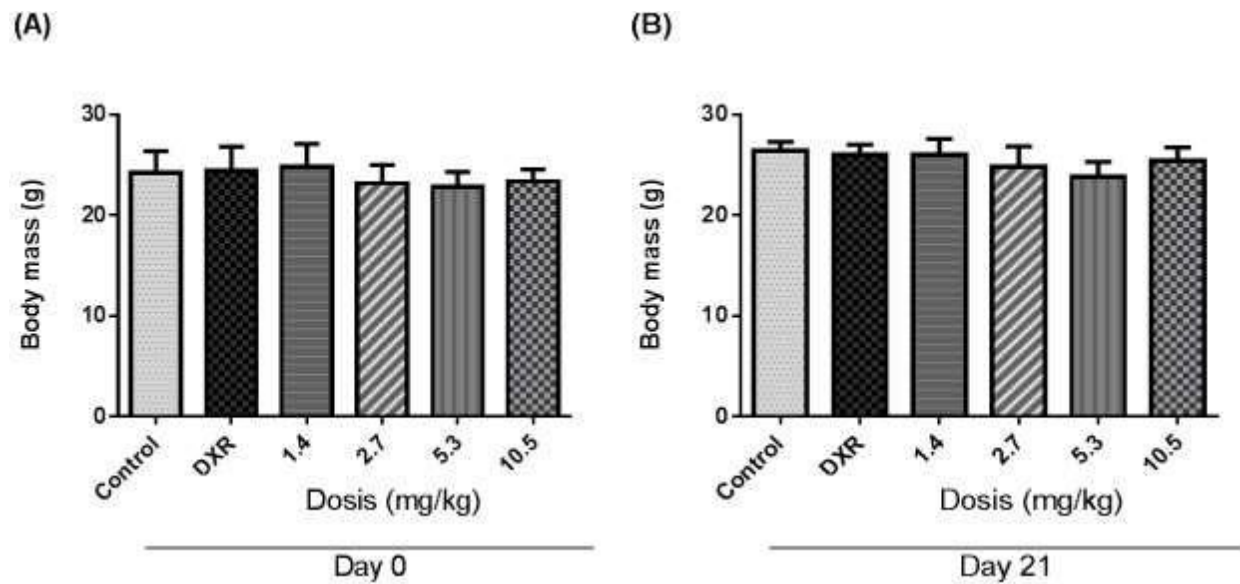


Table 1: Frequencies of micronucleated polychromatic erythrocytes (PCEMNs) in peripheral blood of Swiss mice treated with different concentrations of EA of and their respective controls.

TREATMENT (mg/kg b. w.)	PCEMNs				
	1 day	2 days	7 days	14 days	21 days
Control	3.6 ± 0.54	3.8 ± 0.83	3.4 ± 1.14	3.6 ± 0.54	3.6 ± 0.89
1.4	3.2 ± 0.83	3.6 ± 0.54	3.4 ± 0.89	3.6 ± 0.54	3.8 ± 0.44
2.7	4.0 ± 1.0	4.4 ± 0.54	3.6 ± 0.54	3.8 ± 4.4	4.2 ± 0.44
5.3	3.2 ± 0.44	4.6 ± 0.54	3.4 ± 0.89	3.8 ± 1.09	4.4 ± 1.14
10.5	3.8 ± 0.83	5.0 ± 1.22	4.4 ± 1.14	4.2 ± 0.44	5.0 ± 0.70

Results are expressed as mean ± standard deviation. (ANOVA and Tukey's test). PCEMNs: Micronucleated polychromatic erythrocyte frequencies.

Table 2: Nuclear division index (NDI) in peripheral blood of mice submitted to different concentrations of ellagic acid and / or DXR and their respective controls.

Treatment (mg / kg b. w.)	NDI Mean ± SD				
	1 day	2 days	7 days	14 days	21 days
Controle	0.03 ± 0.004	0.03 ± 0.02	0.03 ± 0.004	0.03 ± 0.007	0.03 ± 0.01
1.4	0.02 ± 0.006	0.02 ± 0.005	0.02 ± 0.008	0.02 ± 0.004	0.02 ± 0.005
2.7	0.02 ± 0.004	0.02 ± 0.002	0.02 ± 0.009	0.02 ± 0.005	0.02 ± 0.005
5.3	0.02 ± 0.008	0.02 ± 0.005	0.03 ± 0.004	0.02 ± 0.002	0.02 ± 0.003
10.5	0.03 ± 0.009	0.02 ± 0.005	0.03 ± 0.006	0.03 ± 0.005	0.03 ± 0.004
DXR	0.02 ± 0.002	0.02 ± 0.002	-	-	-
1.4 + DXR	0.02 ± 0.004	0.03 ± 0.002	-	-	-
2.7 + DXR	0.02 ± 0.003	0.03 ± 0.003	-	-	-
5.3 + DXR	0.02 ± 0.002	0.02 ± 0.003	-	-	-
10.5 + DXR	0.02 ± 0.005	0.02 ± 0.003	-	-	-

Values are expressed as mean + standard deviation. (ANOVA and Tukey's test). 400 erythrocytes were analyzed per animal, with a total of 2000 cells per treatment group; NDI: Nuclear division index; DXR: Doxorubicin.

Table 3. Effect of ellagic acid on erythrocyte parameters and leukogram of Swiss mice.

Parameters	Groups				
	control	1.4 mg/kg/ days	2.7 mg/kg/ days	5.3 mg/kg/ days	10.5 mg/kg/ days
RBC ($10^6/\mu\text{L}$)	7.91 $\pm$ 3.23	8.54 $\pm$ 0.44	8.71 $\pm$ 1.054	8.82 $\pm$ 0.45	8.93 $\pm$ 0.15
Hb (g/dL)	12.2 $\pm$ 3.39	13.8 $\pm$ 0.14	13.5 $\pm$ 0.98	12.95 $\pm$ 0.77	13.55 $\pm$ 0.49
Ht (%)	42.5 $\pm$ 1.53	43.25 $\pm$ 0.35	41.65 $\pm$ 1.32	39.7 $\pm$ 0.98	40.1 $\pm$ 1.27
WBC ($10^3/\mu\text{L}$)	7.41 $\pm$ 0.36	6.64 $\pm$ 0.31	6.87 $\pm$ 0.50	7.38 $\pm$ 0.53	8.28 $\pm$ 0.27
Neutrófilos (%)	18.95 $\pm$ 1.17	29.85 $\pm$ 0.21	22.75 $\pm$ 1.16	21.55 $\pm$ 0.77	20.15 $\pm$ 1.48
Linfócitos (%)	73.5 $\pm$ 1.52	65.8 $\pm$ 1.11	63.85 $\pm$ 0.77	66.15 $\pm$ 1.20	78.2 $\pm$ 0.28
Monócitos (%)	1.7 $\pm$ 0.42	1.35 $\pm$ 0.07	1.45 $\pm$ 1.06	1.8 $\pm$ 0.28	1.9 $\pm$ 2.12
Eosinófilos (%)	1.7 $\pm$ 0.56	1.55 $\pm$ 0.07	1.75 $\pm$ 0.21	1.75 $\pm$ 0.07	1.1 $\pm$ 0.56

Values were expressed as mean $\pm$ standard deviation (n = 5). There was no statistically significant difference between the groups evaluated (ANOVA and Tukey's test) (p <0.05). RBC (total erythrocytes), Hb (Hemoglobin), Ht (Hematocrit), WBC (Total leukocytes).

Table 4. Effect of ellagic acid on the mean organs mass of treated mice and their respective control groups.

Treatment	Dose (mg/kg/ days)	Organs (g / 100 g body mass)				
		Liver	Spleen	Heart	Right Kidney	Left kidney
Control	-	3.64 $\pm$ 0.42	0.23 $\pm$ 0.0004	0.50 $\pm$ 0.04	0.82 $\pm$ 0.13	0.73 $\pm$ 0.07
DXR	15	6.53 $\pm$ 0.10 **	0.18 $\pm$ 0.01	0.53 $\pm$ 0.004	0.63 $\pm$ 0.17	0.70 $\pm$ 0.06
	1.4	4.25 $\pm$ 0.20	0.20 $\pm$ 0.02	0.51 $\pm$ 0.01	0.64 $\pm$ 0.02	0.67 $\pm$ 0.02
	2.7	4.59 $\pm$ 0.14	0.18 $\pm$ 0.02	0.59 $\pm$ 0.04	0.71 $\pm$ 0.02	0.67 $\pm$ 0.01
Ellagic acid	5.3	5.33 $\pm$ 0.53 *	0.25 $\pm$ 0.03	0.74 $\pm$ 0.15	0.75 $\pm$ 0.05	0.70 $\pm$ 0.09
	10.5	4.56 $\pm$ 0.38	0.25 $\pm$ 0.08	0.62 $\pm$ 0.19	0.77 $\pm$ 0.05	0.74 $\pm$ 0.04

Values were expressed as mean $\pm$ standard deviation. Significant differences between the values were expressed as * (p <0.05) and ** (p <0.01) compared to the control group (negative) (ANOVA and Tukey's test). DXR: Doxorubicin.

Anexo 5 – Manuscrito:

Potencial genotóxico e alterações histopatológicas em camundongos Swiss tratados com Doxorrubicina: toxicidade aguda

Everton Pantoja Vale^{a,b}, Ana Paula Santos Rodrigues^b, Robson Carvalho Barbosa^b, Paulo
Goberlanio de Barros Silva^d, Francisco Fábio Oliveira de Sousa^{b,c}, Moacir de Azevedo Bentes
Monteiro Neto^{a,b}.

Affiliation:

^aGenetic and Biomolecular Research Group (GPCBIO), Department of Biological Sciences and Health, Federal University of Amapá, Rod. Juscelino Kubitscheck, km 02, S / N, Macapá-AP, 68903-419, Brazil.

^bPost-graduate Program in Pharmaceutical Sciences, Department of Biological Sciences and Health, Federal University of Amapá, Rod. Juscelino Kubitscheck, KM 02, S / N, Macapá-AP, 68903-419, Brazil.

^cLaboratory of Quality Control, Bromatology and Microbiology, Federal University of Amapá, Rod. Juscelino Kubitscheck, KM 02, S / N, Macapá-AP, 68903-419, Brazil.

^dDivision of Oral Pathology, UNICHRISTUS, Rua João Adolfe Gurgel, 133 – Cocó – Fortaleza, 60190-060, Brazil

*Author corresponding: email: ep.vale@hotmail.com

RESUMO

A Doxorrubicina ou Doxil® - DXR é um potente fármaco quimioterápico de primeira linha baseado em antraciclinas, utilizada no tratamento de uma ampla gama de cânceres, incluindo cânceres sólidos e hematogênicos **Objetivo:** Explorar o potencial genotóxico e as alterações histopatológicas induzidas no fígado, rim, coração e baço após o uso da DXR. O teste de micronúcleo em eritrócitos policromáticos foi utilizada para avaliar os efeitos genotóxicos e citotóxicos com a administração intraperitoneal de doxorrubicina (dose única, 15 mg / kg, p.c.) após 24 e 48 horas. Além disso foi analisado possíveis efeitos toxicológicos, através da avaliação da massa corpórea e histopatológica durante e após 48 horas respectivamente. Os resultados deste estudos, demonstraram ausências de alterações significativas na massa corpórea. Entretanto foi evidenciado aumento na frequência de micronúcleos em eritrócitos policromáticos, demonstrando um efeito genotóxico, porém, no Índice

de divisão nuclear (IDN), não evidenciou citotoxicidade. Foram evidenciadas alterações significativas no fígado e rins. Considerando estes achados, deve-se ter cautela no uso da doxorubicina devido a seus efeitos genotóxicos e alguns efeitos histopatológicos em diferentes órgãos.

Palavras-chave: Doxorubicina; Genotoxicidade; Alterações histopatológicas

INTRODUÇÃO

A Doxorubicina ou Doxil® (DXR) é considerado um potente fármaco quimioterápico de primeira linha baseado em antraciclinas, utilizada desde 1969 no tratamento de uma ampla gama de cânceres, como leucemias agudas, linfomas, sarcomas de tecido mole e tumores sólidos como cancro da mama, sendo descoberto a partir de uma cepa multada de *Streptomyces peucetius* subsp. *caesius* ATCC 27952, uma estirpe mutante derivada de *S. peucetius* ATCC 29050^{1,2,3,4} (ARCAMONE et al., 1969; RENU, et al., 2018; XU, et al., 2018; NAVARRO-ULLOA, et al., 2018).

No avanço das pesquisas sobre o câncer, o interesse cresceu na topoisomerase II, após a descoberta de que é alvo de drogas anticâncer ativas, como a DXR⁵ (ROCHETTE et al., 2015). Sendo assim, existe diversos mecanismos de ação da DXR como o envenenamento por topoisomerase II, decorrido da clivagem na fita dupla do DNA, inibindo assim a mesma (YANG, et al., 2014), além desse mecanismo, a doxorubicina induz a inibição da síntese de proteínas e replicação de DNA pela capacidade de intercalar-se ao DNA, assim como pela geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), que danificam os componentes celulares, (SZWED; JOZWIAK, 2014; TOMASINI, 2018).

Apesar de seus efeitos terapêuticos, existem limitações ao seu uso, que vai desde a resistência a droga até efeito de toxicidade, apresentando uma toxicidade aguda dentro de dois ou três dias após o seu uso e cardiotoxicidade crônica encontrada após várias semanas ou até vários meses após a administração da mesma (RENU, et al., 2018). Sendo assim, a citotoxicidade de uma substância, são diretamente proporcionais as suas concentrações, além do tempo de exposição do indivíduo com o mesmo (KUMAR et al., 2009).

Neste contexto, a presente investigação foi feita para avaliar o potencial efeito genotóxico e citotóxico da DXR em células eritrocitárias policromáticas de camundongos machos Swiss usando o teste de micronúcleo como marcador de genotoxicidade e citotoxicidade. As investigações histopatológicas sobre o efeito nos tecidos do fígado, coração, baço e rins também foram avaliados.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 PRODUTO QUÍMICO

O antibiótico quimioterápico doxorrubicina (DXR) (Rubidox® Smartfarma Ltda., São Paulo, SP).

2.2 ANIMAIS E TRATAMENTO

Camundongos Swiss machos adultos (6 – 7 semanas de vida e aproximadamente $25 \text{ g} \pm 5$ de peso corpóreo (p.c.) obtidos do Biotério do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência de Animais de Laboratório (CEMIB) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas – SP, Brasil. Os mesmos foram mantidos em caixas plásticas (5 por caixas) em uma sala experimental, sob condições controladas de temperatura ($23 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$), umidade ($50 \pm 10\%$), 12 horas de ciclo claro-escuro, com acesso *ad libitum* a ração e água. Os protocolos experimentais relatados neste estudo, foram realizados de acordo com a legislação para experimentação animal estabelecida pelo Conselho Nacional de Experimentação Animal do Brasil (CONCEA). Todos os protocolos experimentais foram revisados e aprovados pelo Comitê de Ética em Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Amapá UNIFAP sob número de protocolo 016/2017.

2.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Após o período de aclimatização dos camundongos no laboratório, os animais foram submetidos a jejum durante a noite, antes do tratamento.

Grupo I: Controle Negativo (Água).

Grupo II: Grupo teste - DXR

Os animais foram tratados com dose única de DXR (15 mg / kg, peso corpóreo (p.c.)), por via intraperitoneal (i.p.). Para o teste de micronúcleo, as amostras foram coletadas 24 e 48 horas após o tratamento. Para a avaliação histopatológica, as amostras foram coletadas após 48 horas. As análises do peso corpóreo foram avaliados durante todo o período de tratamento até a coleta das amostras.

2.4 PARÂMETROS AVALIADOS

2.4.1 MASSA CORPÓREA DOS ANIMAIS

A mensuração da massa corpórea dos animais foi realizada desde o primeiro dia do experimento, avaliando a variação do peso (ganho ou perda de massa corpórea).

2.4.2 TESTE DO MICRONÚCLEO

O teste de micronúcleo foi realizado de acordo com o método descrito por MacGregor et al. (1980) com modificações: Cortou - se a ponta da cauda dos animais e gotejou - se o sangue diretamente sobre as lâminas secas, previamente limpas com metanol, foram realizados os esfregaços sanguíneos e o mesmo seco em temperatura ambiente. Após a secagem do material, o mesmo foi fixado em metanol por 5 minutos; Logo em seguida, após a fixação, as lâminas foram secas em temperatura ambiente; No dia seguinte, as lâminas foram coradas com Giemsa diluído de acordo com o Manual de Diagnóstico Laboratorial da Malária (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009), sendo 0,75g (Giemsa em pó) 35mL (Glicerol PA) e 65mL (Álcool Metílico PA), utilizando a proporção de 1:10 (Giemsa/Água Tamponada), por 20 minutos; Posteriormente, após a coloração, as lâminas foram lavadas para retirada do excesso de corante; As lâminas foram secas a temperatura ambiente e após a secagem, as mesmas foram lidas em microscópio óptico, na objetiva de imersão (100x).

Os eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCMN) em amostras de sangue periférico de camundongos Swiss, foi calculado a partir de 2000 células e o índice de divisão nuclear (IDN) foi determinado pela relação (NCE) (PCE / NCE) calculado a partir de 400 eritrócitos por lâmina.

2.4.3 EXAME HISTOPATOLÓGICO

Para a avaliação histológica, foram coletadas e analisadas quanto a sinais de lesões, tamanho e mudanças de cor dos seguintes espécimes (fígado, baço, coração, rim direito e rim esquerdo). Os órgãos foram pesados para calcular a massa relativa (MR) individualmente, utilizando a equação: $MR = (massa\ do\ órgão \times 100) / massa\ do\ animal$. Posteriormente, as peças foram seccionadas, colocadas em cassetes e seguidas para processamento histotécnico automatizado. Cortes de 4 μm de espessura foram feitos para confecção de lâminas coradas por Hematoxilina-Eosina e montadas em bálsamo de Canadá (JUNQUEIRA, JUNQUEIRA, 1983) para análise em microscópio de luz convencional quanto à presença de alterações específicas de cada órgão.

2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados estatisticamente por análise de variância (ANOVA) para experimentos totalmente aleatórios, com o cálculo da estatística F e de seus respectivos “p-value”. Nos casos em que $p < 0,05$, as médias de tratamento foram comparadas pelo método de Tukey, com o cálculo da diferença mínima significativa para $\alpha = 0,05$, utilizando o programa Graphpad Prism 7.

3 RESULTADOS

3.1 MASSA CORPÓREA DOS ANIMAIS

Neste estudo, não evidenciamos mudanças significativas na massa corpórea (g) dos animais estudados durante os experimentos ($p > 0,05$).

3.2 TESTE DE MICRONÚCLEO

Com base nos resultados obtidos neste estudo, utilizando o teste de micronúcleo em sangue periférico de camundongos Swiss, verificou-se que o tratamento com a doxorubicina ocasionou um aumento significativo ($p < 0,001$) na frequência de micronúcleo em eritrócitos policromáticos provocando genotoxicidade nestas células quando comparado com o grupo controle negativo (CN). Além disso, a análise do índice de divisão nuclear (IDN), o tratamento com doxorubicina não apresentou redução na relação eritrócitos policromáticos (PCE) e eritrócitos normocromáticos comparando com o grupo controle negativo ($p > 0,05$), demonstrando ausência de efeitos citotóxicos nestas células (Tabela 1).

3.3 EXAME HISTOPATOLOGICO

Após análise do exame histológico dos órgãos, não foram observado qualquer alteração macroscópica dos órgãos, considerando os parâmetros: cor, textura, tamanho e forma. Entretanto, o grupo tratado com DXR apresentou um aumento significativo de peso médio do fígado ($p < 0.01$) em relação ao grupo controle, demonstrado na (Tabela 2). Nos parâmetros histopatológicos, verificamos a ocorrência esporádica de lesões, sugerindo que o tratamento com DXR não alterou os níveis de gravidades, uma vez que a maioria das alterações morfológicas observadas nos animais tratados com DXR também foi observada no grupo controle. No entanto, algumas alterações distintas em alguns órgãos foram evidenciadas nos animais tratados com DXR, no fígado, foi observada hemorragia sinusoidal e áreas de edema, porém, não se observaram focos de células inflamatórias. No Baço, a polpa branca se encontrava hiperplásica. Nos Rins, observaram-se áreas de hemorragia tubular e intersticial na maioria dos casos. Neste contexto, verificamos uma fraca toxicidade com o tratamento agudo pela DXR neste estudo.

4. DISCUSSÃO

A doxorubicina (DXR) é um antibiótico (antraciclina) isolado de *Streptomyces peucetius* subsp. *caesius*, sendo considerado um quimioterápicos de amplo espectro de uso mais comum, aplicado clinicamente durante anos para prevenir a recorrência de tumor, exercendo seu efeito antitumoral através da inibição da topoisomerase II, (YU et al., 2017), porém, seu uso pode causar toxicidades em múltiplos órgãos (RENU, et al., 2018).

Os resultados deste estudo demonstram que não houve alteração significativa na massa corpórea dos camundongos, entretanto, observamos um efeito genotóxico e um efeito não citotóxico em eritrócitos policromáticos de camundongos Swiss. Tais resultados corroboram com os achados de outros autores (MONTEIRO NETO, et al., 2011; ALVES, et al., 2013; CARNEIRO, et al., 2017) que identificaram o potencial genotóxico da doxorubicina em sangue periférico utilizando o teste de micronúcleo. Os autores registram uma elevação significativa na frequência de micronúcleos em eritrócitos policromáticas em relação ao grupo controle negativo, sugerindo que a doxorubicina representa um risco genotóxico para os indivíduos que fazem o uso do mesmo. Esse efeito deve estar diretamente ligado com o mecanismo de ação da DXR. Vários mecanismos são sugeridos, tais como, a intercalação em DNA nuclear e mitocondrial, inibição da enzima topoisomerase II, porém, o papel do estresse oxidativo continua sendo o mecanismo mais provável para os efeitos adversos da doxorubicina, provocando danos no material genético e na estrutura celular, podendo levar a morte da mesma (PUGAZHENDHI, et al., 2018). Isto pode explicar os danos induzidos no material genético em células de sangue periférico de camundongos Swiss pela via intraperitoneal no presente estudo.

Estudos histopatológicos são importantes para a avaliação de toxicidade de uma substância. Neste sentido, foi evidenciado alterações histopatológicas no fígado, observando-se hemorragia sinusoidal e áreas de edema, porém não observaram-se focos de células inflamatórias quando comparado com o grupo controle, além disso foi evidenciando um aumento na massa corpórea do fígado. Resultados que corroboram com outros estudos que verificou-se a hepatotoxicidade como

um dos principais efeitos secundários associados à administração da doxorubicina, isto pode estar relacionado com o fato da DXR inibir a glutathione peroxidase hepática e a atividade da glutathione-S-transferase, ocasionando assim, danos oxidativos (OMOBOWALE, et al., 2018).

Os rins são órgãos que são expostos frequentemente aos efeitos de xenobióticos, devidos as suas funções vitais. A DXR desencadeia efeitos tóxicos presentes pela geração de radicais livres, produção de peroxidação lipídica e dano oxidativo em tecidos e órgãos em doses únicas até 20 mg / kg, indicando a deterioração da função renal em ratos. (CARVALHO, et al., 2009; ALTINKAYNAK, et al., 2018). Estes podem explicar as alterações histopatológicas, observadas nos rins notáveis cilindros - hialinos e áreas de hemorragia tubular e intersticial na maioria dos casos observados no presente estudo após o tratamento com DXR.

Nas amostras do baço e do coração, não foi identificado alterações significativas, entretanto, em uma das amostras, a polpa branca se encontrava hiperplásica, além disso, foi identificado predominantemente tecido muscular estriado cardíaco, apresentando preservação de fibras longitudinais e transversais, e ausência de pigmentos de hemossiderina ou lipofuscina respectivamente. Com base nestes resultados, podemos pressupor que a administração intraperitoneal na dose de 15 mg / kg, p.c. em dose única não provoca danos significativos no baço e coração (48 horas após o tratamento). Entretanto a cardiotoxicidade aguda tem uma incidência de aproximadamente 11% e manifestam-se tipicamente poucos dias após o início do tratamento com doxorubicina (Luu, et al., 2018). Neste contexto, a aplicação clínica da DXR no tratamento de longo prazo é restrita devido a seus efeitos colaterais consideráveis e particularmente no desenvolvimento de hepatotoxicidade, cardiotoxicidades e nefrotoxicidades (DAS, J., GHOSH, J., MANNA, P., SIL, P.C., 2011) Isso pode explicar os resultados de não ter ocorrido nenhuma alteração histopatológica no coração neste intervalo de 48 horas, visto que o tempo de tratamento, foi o principal fator responsável para o não surgimento dessas alterações neste estudo.

Entretanto, a cardiotoxicidade após o uso DXR tem sido frequentemente relatada, principalmente pelo tratamento crônico, acredita-se que a principal contribuição para o surgimento

da cardiotoxicidade seja a indução de formação de radicais livres e subsequente o estresse oxidativo, provocando a ativação das vias de sinalização apoptóticas e posteriormente, levando a danos nos cardiomiócitos (YUHONG, et al., 2018).

Considerando estes fatos, deve-se ter cautela no uso da doxorrubicina devido a seus efeitos genotóxicos e alguns efeitos histopatológicos, este estudo contribuiu para o conhecimento dos efeitos da doxorrubicina no organismo, visto que, os mecanismo de ação e os seus efeitos não são bem explicados.

CONCLUSÃO

A Doxorrubicina apresentou em efeito citogenéticos em eritrócitos policromáticos de camundongos Swiss, evidenciando o potencial genotóxico do mesmo, além disso, foi observado pequenas alterações histopatológica em alguns órgãos, demonstrando um efeito toxicológico fraco sobre o organismo, mesmo que o tratamento tenha sido de forma aguda, desta forma, cuidados devem ser tomados com o uso do mesmo, pois com tratamentos prolongados com a DXR, o nível de efeitos colaterais podem aumentar gradativamente.

Com base nisto, mais estudos devem ser realizados, com o intuito de garantir uma segurança maior aos usuários deste medicamento.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a todos que contribuíram para a realização dessa pesquisa, ao financiamento feito pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) / Fundação de Amparo à Pesquisa do Amapá (FAPEAP), Universidade Federal do Amapá (UNIFAP) e ao Centro Universitário Unichristus.

REFERÊNCIAS

ARCAMONE F., G. CASSINELLI , G. FANTINI , A GREIN , P OREZZI , C POL , C SPALLA. Adriamycin 14-hydroxydaunomycin, um novo antibiótico antitumoral de *Streptomyces peucetius* var. *Caesius*. **Biotechnol Bioeng** , 11 (6), pp. 1101 – 1110, 1969.

- ALTINKAYNAK, Y.; KURAL, B.; AKCAN, B. A.; BODUR, A.; ÖZER, S.; YULUĞ, E.; ÖREM, A. Protective effects of L-theanine against doxorubicin-induced nephrotoxicity in rats. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, 108, 1524-1534, 2018.
- ALVES, J. M.; MUNARI, C. C.; MONTEIRO NETO, M. A. B.; FURTADO, R. A.; SENEDESE, J. M.; BASTOS, J. K.; TAVARES, D. C. In vivo protective effect of *Copaifera langsdorffii* hydroalcoholic extract on micronuclei induction by doxorubicin. **Journal of Applied Toxicology**, v. 33, p. 854-860, 2013.
- CARNEIRO, A. B.; AURÉLIO, P.; SERRÃO, E. J. P.; RIBEIRO, I. F.; MAGALHÃES, M. R. G.; MONTEIRO NETO, M. A. B. Efeito da *Astrocaryum aculeatum* (Tucumã) na toxicidade da Doxorubicina: modelo experimental in vivo. **Acta Paulista de Enfermagem**, v. 30, p. 233-239, 2017.
- CARVALHO, C.; SANTOS, R. X.; CARDOSO, S.; CORREIA, S.; OLIVEIRA, P. J.; SANTOS, M. S.; MOREIRA, P. I. Doxorubicin: the good, the bad and the ugly effect. **Current medicinal chemistry**, 16(25), 3267-3285, 2009.
- DAS, J.; GHOSH, J.; MANNA, P.; SIL, P.C. Taurine suppresses doxorubicin-triggered oxidative stress and cardiac apoptosis in rat via up-regulation of PI3-K/Akt and inhibition of p53, p38-JNK. **Biochem. Pharmacol.** 81 (7), 891e909, 2011.
- DOS SANTOS, H. S.; DE SOUZA CRUZ, W. M. A terapia nutricional com vitaminas antioxidantes e o tratamento quimioterápico oncológico. **Revista Brasileira de Cancerologia**, 47(3), 303-08, 2001.
- JUNQUEIRA, L. C. U.; JUNQUEIRA L. M. M. S. Técnicas básicas de citologia e histologia. Rio de Janeiro. Ed. Guanabara Koogan, 1983.
- KUMAR, M. R.; AITHAL, K.; RAO, B. N.; UDUPA, N.; RAO, B. S. Cytotoxic, genotoxic and oxidative stress induced by 1,4-naphthoquinone in B16F1 melanoma tumor cells. **Toxicol In Vitro**. v.23, n.2, p.242-250, 2009.
- LUU, A. Z.; CHOWDHURY, B.; AL-OMRAN, M.; TEOH, H.; HESS, D. A.; VERMA, S. Role of Endothelium in Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy. **JACC: Basic to Translational Science**, 3(6), 861-870, 2018.
- MACGREGOR, J. T.; WEHR, C. M.; GOULD, D. H. Clastogen-induced micronuclei in peripheral blood erythrocytes: The basis of an improved micronucleus test. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 2, n. 4, p. 509-514, 1980.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Manual de diagnóstico laboratorial da malária. Série A. Normas e Manuais Técnicos. **Ministério da Saúde**, Brasília, 2º ed., 2009.
- MONTEIRO NETO, M. A. B.; LIMA, I. M. S.; FURTADO, R. A.; BASTOS, J. K.; SILVA FILHO, A. A.; TAVARES, D. C.; SOUZA LIMA, ILDERCÍLIO MOTA. Antigenotoxicity of artemisinin in vivo evaluated by the micronucleus and comet assays. **JAT. Journal of Applied Toxicology**, v. 31, p. 714-719, 2011.
- NAVARRO-ULLOA, O. D.; BARRANCO-CAMARGO, L. A.; JURADO-LÓPEZ, S. P.; ZABALA-CARBALLO, C. I.; GIRALDO-PENICHE, L. E. Muerte súbita debida a cardiotoxicidad aguda inducida por antraciclinas. **Revista Colombiana de Cardiología**, 25(1), 80-e1, 2018.

OMOBOWALE, T. O.; OYAGBEMI, A. A.; AJUFO, U. E.; ADEJUMOBI, O. A.; OLA-DAVIES, O. E.; ADEDAPO, A. A.; YAKUBU, M. A. Ameliorative effect of gallic acid in doxorubicin- induced hepatotoxicity in Wistar rats through antioxidant defense system. *Journal of dietary supplements*, 15(2), 183-196, 2018.

PUGAZHENDHI, A.; EDISON, T. N. J. I.; VELMURUGAN, B. K.; JACOB, J. A.; KARUPPUSAMY, I. Toxicity of Doxorubicin (Dox) to different experimental organ systems. *Life sciences*, 2018.

ROCHETTE, L.; GUENANCIA, C.; GUDJONCIK, A.; HACHET, O.; ZELLER, M.; COTTIN, Y.; VERGELY, C. Anthracyclines/trastuzumab: new aspects of cardiotoxicity and molecular mechanisms. *Trends in pharmacological sciences*, 2015, 36.6: 326-348, 2015.

RENU, K.; ABILASH, V. G.; PB, T. P.; ARUNACHALAM, S. Molecular mechanism of doxorubicin-induced cardiomyopathy—An update. *European journal of pharmacology*, 818, 241-253, 2018.

SZWED, M.; JOZWIAK, Z. Genotoxic effect of doxorubicin–transferrin conjugate on human leukemia cells. Mutation Research/Genetic **Toxicology and Environmental Mutagenesis**, 771, 53-63, 2014.

TOMASINI, P. P. Análise do óleo essencial de Piper gaudichaudianum na citotoxicidade da doxorubicina. (**Doctoral dissertation**) 2018.

XU, Y. C.; LIU, X.; LI, M.; LI, Y.; LI, C. Y.; LU, Y.; ZUO, S. B. Novel mechanism of doxorubicin resistance and tumorigenesis mediated by microRNA-501-5p suppressed BLID. **Molecular Therapy-Nucleic Acids**. 2018.

YANG F.; TEVES S. S.; KEMP C. J.; HENIKOFF S. Doxorubicin, DNA torsion, and chromatin dynamics. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer**, 1845(1), 84-89., 2014

YUHONG, G.; TINGTING, D.; JINGXIA, Z.; XIAOLONG, X.; PING, L.; LIJUAN, H.; QINGQUAN, L. Fuxin decoction attenuates doxorubicin-induced heart failure in rats via oxidizing suppression and regulating immune responses. *Journal of Traditional Chinese Medicine*, 38(4), 579-584, 2018.

YU, D. S.; YAN, H. Y.; WU, C. L.; HUNG, S. H. Comparison of therapeutic efficacy of lipo-doxorubicin and doxorubicin in treating bladder cancer. *Urological science*, 28(4), 200-205, 2017.

Tabela 1: Média e desvio padrão da frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCMN) e do Índice de divisão nuclear com suas respectivas média e desvio padrão em sangue periférico de camundongos Swiss (24 horas, 48 horas,) de animais tratados com doxorubicina e seu respectivo controle.

TRATAMENTO (mg/kg p. c.)	EPCMNs		IDN	
	Média $\pm$ DP ^a		Média $\pm$ DP ^a	
	24	48	24	48
	Horas	Horas	Horas	Horas
Controle	3,6 $\pm$ 0,54	3,8 $\pm$ 0,83	0,03 $\pm$ 0,004	0,03 $\pm$ 0,02
DXR	28 $\pm$ 0,89	46,4 $\pm$ 0,89	0,02 $\pm$ 0,002	0,02 $\pm$ 0,002

Os valores foram expressos como Média $\pm$ Desvio padrão. Houve diferença estatística significativa entre o grupo avaliado em comparação com o grupo controle (ANOVA e Teste de Tukey). EPCMN: frequências de eritrócitos policromáticos micronucleados; IDN: Índice de divisão nuclear.

Tabela 2. Efeito da doxorubicina (DXR) sobre a massa média dos órgãos dos animais tratados com diferentes concentrações.

Tratamento	Dose (mg/kg/dia)	Órgãos (g/100g de massa corpórea)				
		Fígado	Baço	Coração	Rim Direito	Rim Esquerdo
Controle	-	3,64 $\pm$ 0,42	0,23 $\pm$ 0,0004	0,50 $\pm$ 0,04	0,82 $\pm$ 0,13	0,73 $\pm$ 0,07
DXR	15	6,53 $\pm$ 0,10 **	0,18 $\pm$ 0,01	0,53 $\pm$ 0,004	0,63 $\pm$ 0,17	0,70 $\pm$ 0,06

Os valores foram expressos como média $\pm$ desvio padrão. Diferenças significativas entre os valores foram expressas como ** ($p < 0.01$) em comparação com o grupo controle (negativo) (ANOVA e Teste de Tukey).