

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Faculdade De Farmácia
Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas

Nathalia Stephanie Oliveira Nascimento

**AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E GENOTOXICIDADE DO ÓLEO
DE COPAÍBA (*Copaifera Multijuga* Hayne) E DE FORMULAÇÃO
FITOTERÁPICA À BASE DO ÓLEO RESINA**

Belo Horizonte

2023

Nathalia Stephanie Oliveira Nascimento

**AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E GENOTOXICIDADE DO ÓLEO
DE COPAÍBA (*Copaifera Multijuga* Hayne) E DE FORMULAÇÃO
FITOTERÁPICA À BASE DO ÓLEO RESINA**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestra em Análises Clínicas e Toxicológicas.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Tagliati

Coorientador: Dr. Jonas Pereira Ramos

Belo Horizonte

2023

N244a Nascimento, Nathalia Stephanie Oliveira.
Avaliação da citotoxicidade e genotoxicidade do óleo de copaíba (*Copaifera Multijuga Hayne*) e de formulação fitoterápica à base do óleo resina [recurso eletrônico] / Nathalia Stephanie Oliveira Nascimento. – 2023.

1 recurso eletrônico (79 f. : il.) : pdf

Orientador: Carlos Alberto Tagliati.
Coorientador: Jonas Pereira Ramos.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas.

Exigências do sistema: Adobe Acrobat Reader.

1. Plantas medicinais – Teses. 2. Óleos vegetais – Teses. 3. Fitoterápicos – Teses. 4. Toxicidade – Teses. 5. Gravidez – Doenças – Teses. I. Tagliati, Carlos Alberto. II. Ramos, Jonas Pereira. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. IV. Título.

CDD: 665.3



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS

FOLHA DE APROVAÇÃO

**"AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E GENOTOXICIDADE DO ÓLEO DE COPAÍBA
(*Copaifera multijuga hayne*) E DE FORMULAÇÃO FITOTERÁPICA À BASE DO ÓLEO
RESINA"**

NATHALIA STEPHANIE OLIVEIRA NASCIMENTO

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada, no dia onze de maio de dois mil e vinte e três, pela Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade Federal de Minas Gerais constituída pelos seguintes professores:

Priscilla Rodrigues Valadares Campana

UFMG

Jonas Pereira Ramos

UFMG

Karina Braga Gomes Borges

UFMG

Carlos Alberto Tagliati - Orientador

UFMG

Belo Horizonte, 11 de maio de 2023.



Documento assinado eletronicamente por **Carlos Alberto Tagliati, Membro**, em 15/05/2023, às 12:05, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Jonas Pereira Ramos, Usuário Externo**, em 18/05/2023, às 10:06, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

Folha de Aprovação FARMACIA-SECCPGACT 2301764 SEI 23072.229024/2023-03 / pg. 1



Documento assinado eletronicamente por **Priscilla Rodrigues Valadares Campana, Professora do Magistério Superior**, em 18/05/2023, às 15:51, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Karina Braga Gomes Borges, Professora do Magistério Superior**, em 22/05/2023, às 11:37, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site

[https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0)

[acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **2301764** e o código CRC **1647A07F**.

Referência: Processo nº 23072.229024/2023-03 SEI nº 2301764 Folha de Aprovação FARMACIA-SECCPGACT 2301764 SEI 23072.229024/2023-03 / pg. 2



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Às 14:00 horas do dia onze de maio de dois mil e vinte e três, na sala 3062, Faculdade de Farmácia da UFMG, realizou-se a sessão pública para a defesa da Dissertação de **Nathalia Stephanie Oliveira Nascimento**. A presidência da sessão coube ao **Carlos Alberto Tagliati**, orientador. Inicialmente, o presidente fez a apresentação da Comissão Examinadora assim constituída: **Priscilla Rodrigues Valadares Campana**, UFMG; **Jonas Pereira Ramos**, UFMG; **Karina Braga Gomes Borges**, UFMG; e **Carlos Alberto Tagliati**, UFMG, orientador. Em seguida, a candidata fez a apresentação do trabalho que constitui sua **Dissertação de Mestrado**, intitulada: "**AValiação DA CITOTOXICIDADE E GENOTOXICIDADE DO ÓLEO DE COPAÍBA (*Copaifera multijuga hayne*) E DE FORMULAÇÃO FITOTERÁPICA À BASE DO ÓLEO RESINAS**" e guiou-se a arguição pelos examinadores e logo após, a Comissão reuniu-se, sem a presença da candidata e do público e decidiu considerar **aprovada** a **Dissertação de Mestrado**. O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o presidente encerrou a sessão e lavrou a presente ata que, depois de lida, se aprovada, será assinada pela Comissão Examinadora.

Belo Horizonte, 11 de maio de 2023.

Assinatura dos membros da banca examinadora:

Priscilla Rodrigues Valadares Campana, UFMG

Jonas Pereira Ramos, UFMG

Karina Braga Gomes Borges, UFMG

Carlos Alberto Tagliati, UFMG, orientador



Documento assinado eletronicamente por **Carlos Alberto Tagliati**, **Membro**, em 15/05/2023, às 12:05, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de](#)

[2020.](#)



Documento assinado eletronicamente por **Jonas Pereira Ramos, Usuário Externo**, em 18/05/2023, às 10:08, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.](#)



Documento assinado eletronicamente por **Priscilla Rodrigues Valadares Campana, Professora do Magistério Superior**, em 18/05/2023, às 15:51, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.](#)

Ata de defesa de Dissertação/Tese FARMACIA-SECCPGACT 2301569 SEI 23072.229024/2023-03 / pg. 1



Documento assinado eletronicamente por **Karina Braga Gomes Borges, Professora do Magistério Superior**, em 22/05/2023, às 11:37, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.](#)



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0)

[acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **2301569** e o código CRC **3DF3232A**.

Referência: Processo nº 23072.229024/2023-03 SEI nº 2301569 Ata de defesa de Dissertação/Tese FARMACIA-SECCPGACT 2301569 SEI 23072.229024/2023-03 / pg. 2

"Pois nele vivemos, e nos movemos, e existimos"

Atos 17:28

AGRADECIMENTOS

Primeiramente ao Senhor Jesus que me conduziu a este lindo propósito, patrocinou meus sonhos e cuidou de mim ao longo da minha vida, e não somente nestes anos como mestranda.

À Universidade Federal de Minas Gerais e ao Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da UFMG pela oportunidade de fazer o curso.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) pelo financiamento deste estudo.

Ao Prof^º. Dr. Carlos Alberto Tagliati e Dr. Jonas Pereira Ramos pela orientação, apoio e cuidado. Agradeço à Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) e à Profa Dra. Elisabete Pereira dos Santos e sua equipe de pesquisadores, em especial a Zaida Maria Faria de Freitas, pela parceria e doação das amostras para a execução desse trabalho.

Ao laboratório ToxLab e todos meus colegas de trabalho que contribuíram para a realização desta dissertação e tornaram meus dias mais felizes. Especialmente, à Maria Eduarda Amorim, Bárbara Moreira, Larissa Souza e Vanderli Pacheco.

Meus agradecimentos a minha família e amigos, que sempre acreditaram em mim desde o primeiro instante. Em especial para o meu marido Leilton, que me apoiou e incentivou nas horas difíceis, de ansiedade, desânimo e cansaço.

A minha mãe Euzélia, minha Tia Elizabeth e minha irmã Érica por sempre acreditarem que eu posso voar mais longe. Ao João Lucas que se forma em meu ventre, por ser minha maior fonte de superação e de força.

A todas as pessoas que embarcaram comigo nessa grande trajetória eu agradeço, porque de alguma forma influenciaram meu percurso.

RESUMO

O óleo de copaíba (*Copaifera multijuga*) e seus produtos fitoterápicos são utilizados mundialmente, entretanto o conhecimento sobre sua segurança ainda é limitado, principalmente em relação à toxicidade genética. Os ensaios de genotoxicidade são aqueles empregados para identificar substâncias que possuem a capacidade de interagir com o ácido desoxirribonucléico e gerar modificações de características hereditárias. Essas alterações podem ser relacionadas ao desenvolvimento e/ou predisposição de doenças, aumento da mortalidade, mutações hereditárias e problemas na reprodução. O propósito deste estudo foi avaliar o perfil toxicológico do óleo de copaíba e seus possíveis metabólitos hepáticos de uma formulação fitoterápica à base do óleo resina em conformidade com as diretrizes internacionais da Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD) 487 “Teste Micronúcleo em Células de Mamíferos *in vitro*” em linhagens murinas V79-4 (com e sem mix S9) e humanas, HepG2. Além disso, foram realizados experimentos com iodeto de propídio (PI) em células V79-4 com e sem S9 para determinar como a interação do *Copaifera multijuga* com a metabolização hepática afeta o mecanismo de morte celular e o conteúdo do DNA das células testadas. Nossos resultados indicam que o óleo de *Copaifera multijuga* gera metabólitos hepáticos citotóxicos e genotóxicos *in vitro*. Ademais, a metabolização hepática acrescentou um novo perfil de toxicidade à Copaíba e sugere um novo mecanismo de morte celular por fragmentação de DNA, o que explica a maior toxicidade observada em amostras tratadas com *mix S9* em relação às células sem capacidade de biotransformação hepática. Também observamos que *Copaifera multijuga* +S9 altera a fase (S), etapa mais crítica do ciclo celular, relacionada com o maior risco de eventos adversos e toxicidade genética. Essa abordagem abrangente fornece informações essenciais para a segurança da população no uso de *Copaifera ssp.*

Palavras-chave: óleo de copaíba; citotoxicidade; genotoxicidade; teste de micronúcleo *in vitro*; metabolização hepática; linhagem V79-4 e HepG2

ABSTRACT

Copaiba oil (*Copaifera multijuga*) and its herbal products are used worldwide, however knowledge about its safety is still limited, mainly in relation to genetic toxicity. Genotoxicity assays are those used to identify substances that have the ability to interact with deoxyribonucleic acid and generate changes in hereditary characteristics. These alterations may be related to the development and/or predisposition of diseases, increased mortality, hereditary mortality and reproductive problems. The purpose of this study was to evaluate the toxicological profile of copaiba oil and its possible hepatic metabolites of a herbal formulation based on resin oil in accordance with the international guidelines of the Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) 487 "Test Micronucleus in Cells of Mammals *in vitro*" in murine V79-4 (with and without S9 mix) and human strains, HepG2. In addition, experiments were performed with propidium iodide (PI) in V79-4 cells with and without S9 to determine how the interaction of *Copaifera multijuga* with hepatic metabolism affected the mechanism of cell death and the DNA content of bacterial cells. Our results indicate that *Copaifera multijuga* oil generates cytotoxic and genotoxic hepatic metabolites *in vitro*. In addition, hepatic metabolism added a new toxicity profile to Copaiba and suggests a new mechanism of cell death by DNA fragmentation, which explains the greater toxicity observed in studies treated with S9 mix in relation to cells without hepatic biotransformation capacity. We also observed that *Copaifera multijuga* +S9 alters the (S) phase, the most critical stage of the cell cycle, related to a higher risk of adverse events and genetic toxicity. This comprehensive approach provides essential information for the safety of the population in the use of *Copaifera ssp*.

Keywords: copaiba oil; cytotoxicity. Genotoxicity; *in vitro* micronucleus test; liver metabolism; line V79-4 and HepG2.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Principais fitoquímicos presentes na copaíba	15
Figura 2- Modelos experimentais científicos.....	21
Figura 3 -Bateria de testes <i>in vitro</i>.....	33
Figura 4 -Esquema teste de micronúcleo <i>in vitro</i>	34

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BPL	Boas Práticas de Laboratório
CYP450	Enzimas do citocromo P450
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
HEPG2	Células de hepatoma humano
HGEL	Hidrogel polimérico à base do óleo resina
IFRJ	Instituto Federal do Rio de Janeiro
IEN	Instituto de Engenharia Nuclear
IME	Instituto Militar de Engenharia
INPA	Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia
MF	Medicamento Fitoterápico
MN	Micronúcleo
OECD	Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico
OMS	Organização Mundial da Saúde
POPs	Procedimentos operacionais padronizados
PTF	Produto Tradicional Fitoterápico
RNA	Ácido ribonucleico
S9	Homogenato de fígado de rato
SFB	Soro fetal bovino
PBS	Tampão Salina-Fosfato
UEZO	Universidade Estadual da Zona Oeste
UFAM	Universidade Federal do Amazonas
UFF	Universidade Federal Fluminense
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro
V79-4	Células de fibroblastos pulmonares de Hamster Chinês
3R's	<i>Reduction, Refinement, Replacement</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
1.1. Toxicidade de medicamentos fitoterápicos.....	18
1.2. Eficácia e segurança da <i>Copaifera ssp.</i>	19
1.3. Modelos de experimentação <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	20
1.5.1. Valor preditivo.....	23
1.5.2. Métodos Alternativos ao uso de animais.....	25
1.5.2.1 Cultura celular.....	25
1.5.2.1 Ativação metabólica <i>in vitro</i>	27
1.5.2.1.1 Paridade entre o <i>mix</i> S9 murino e hepatócitos humanos.....	28
1.4. Análise <i>in vitro</i> para toxicidade genética.....	29
1.4.1 Genotoxicidade.....	30
1.4.1.1 Micronúcleo <i>in vitro</i>	31
1.5 Citotoxicidade e morte celular no contexto da genotoxicidade.....	33
1.6. Boas Práticas Laboratoriais Aplicadas à Avaliação da Segurança.....	34
1.6.1 Sistema de Gestão da Qualidade (NBR ISO/IEC 17025:2005).....	35
2. OBJETIVOS.....	36
2.1. Objetivo geral.....	36
2.2. Objetivos específicos.....	36
3. ARTIGO.....	37
4. PERSPECTIVAS.....	58
REFERÊNCIAS.....	59
APÊNDICE A-CLASSIFICAÇÃO BOTÂNICA DA <i>Copaifera multijuga</i>.....	67
APÊNDICE B- REVISÃO DA LITERATURA.....	70
APÊNDICE C- TABELAS.....	73

1. INTRODUÇÃO

A fitoterapia é a ciência que se baseia na utilização de plantas para o tratamento de doenças, por sua vez, os medicamentos fitoterápicos são aqueles originários de matérias-primas ativas vegetais utilizados com um fim terapêutico (paliativo, profilático ou curativo). A composição dos fitoterápicos pode ser simples ou composta, fato que é influenciado pela quantidade de plantas medicinais presentes em sua formulação (SILVA *et al.*, 2021).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) afirma que grande parte da população dos países emergentes utiliza e depende da medicina tradicional para alívio e tratamento de doenças em nível de atenção primária. Estima-se que 85% dessas pessoas utilizem plantas medicinais ou preparações delas em sua rotina (ESTEVEZ *et al.*, 2020).

A ampla empregabilidade desses produtos sobrevém em virtude da presença exacerbada de substâncias químicas com potencial farmacológico presentes nos vegetais (fitoquímicos), quando comparados aos produtos sintéticos, frisando a importância de estudos sobre a eficácia e segurança destes possíveis medicamentos (NOVAIS *et al.*, 2003).

O mercado de fitoterápicos está em expansão em todo o mundo, o país com maior visibilidade neste cenário é a China, no qual os medicamentos fitoterápicos representam cerca de 30-50% das vendas totais de medicamentos (CARVALHO *et al.* 2018). No Brasil, mesmo com os incentivos do mercado financeiro, aceitação do consumidor e da vasta flora presente no Estado, essa expansão não ocorreu como esperado, dado que, a nação brasileira ainda possui poucos produtos fitoterápicos licenciados e o crescimento anual médio é de 5% (CARVALHO *et al.* 2018).

Entretanto, as atuais políticas públicas nacionais, como a legislação brasileira (RDC nº 26/2014), que possibilitou o licenciamento de fitoterápicos em duas categorias, Medicamento Fitoterápico (MF) e Produto Tradicional Fitoterápico (PTF), representam incentivos para o desenvolvimento e recuperação do mercado de produtos fitoterápicos. Essas medidas permitem uma melhor expectativa de retorno sobre os investimentos (CARVALHO *et al.* 2018).

Em 1978, na conferência de Alma-Ata, a OMS trouxe para a discussão global a questão da regulamentação do uso e do desenvolvimento de produtos oriundos de produtos

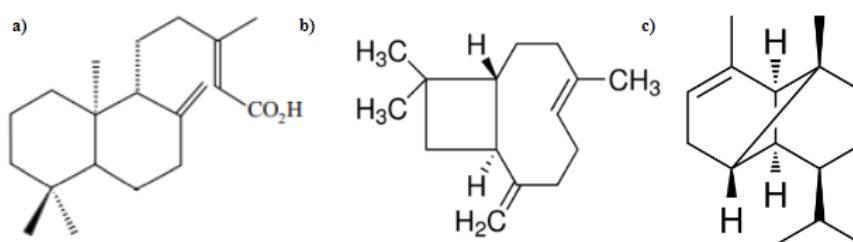
vegetais, que até o momento eram baseados em saberes empíricos e senso comum (ESTEVEES *et al.*, 2020).

Apesar de já ser relatado na literatura a respeito da toxicidade, intrínseca e extrínseca, relacionada a produtos à base de plantas, é comum o uso irracional e indiscriminado pela população, que defende a ideia de inocuidade das plantas para a saúde (PAWLOWSKI *et al.*, 2012). Estudo realizado no Reino Unido revelou que 30% dos consumidores de fitoterápicos têm mostrado reação adversa (JORDAN *et al.*, 2009).

No Brasil, devido à sua vasta biodiversidade, observa-se um perfil marcante na aplicação desses produtos (LORENZI & MATOS, 2008). Entre os fitoterápicos tradicionalmente utilizados em território brasileiro, destaca-se o óleo de copaíba, devido à sua eficácia comprovada para diversos fins e ao seu longo tempo de uso pela população (TEIXEIRA *et al.*, 2017).

A Copaíba pertence ao gênero *Copaifera* (Leguminosae –Caesalpinioideae) e está presente em vários continentes, dentre as espécies de copaíba, nove já foram reconhecidas na Floresta Amazônica no Brasil (MARTINS-DA-SILVA *et al.*, 2008; MONTES *et al.*, 2009). O óleo de copaíba é usado popularmente, principalmente pelo seu efeito anti-inflamatório e cicatrizante, nos quais são atribuídos a presença dos fitoquímicos: ácido copálico e os sesquiterpenos β -cariofileno e o α -copaeno (Figura 1) (MARTINI *et al.*, 2016).

Figura 1. Principais fitoquímicos presentes na copaíba



Fonte: PubChem. (2023). Principais fitoquímicos presentes na copaíba: A. Ácido copálico; B. β -cariofileno; C. α -copaeno.

As aplicações fitoterápicas do óleo de copaíba abrangem todo o território nacional, sendo administrado tanto por via oral quanto tópica (MONTES *et al.*, 2009). Destaca-se o uso desse óleo medicinal no tratamento tópico de feridas, as quais representam um grande

problema de saúde pública devido aos índices elevados e aos custos financeiros onerosos associados ao tratamento no Brasil (MORAIS, 2008).

As feridas são interrupções na continuidade de um tecido corporal, podendo ser crônicas ou agudas, possuem uma grande importância no âmbito social, estético, psicológico e de saúde dos indivíduos e de toda a sociedade (DRIVER, 2010). O óleo resina de *Copaifera multijuga* tem se demonstrado um ótimo tratamento tópico para esse fim. Estudos evidenciaram que esse produto acelera a cicatrização de feridas abertas, justificando assim o seu uso tradicional (PAIVA *et al.*, 2002).

Entretanto, conforme elucidado por Cruz (2015), observa-se que falta validação científica apropriada para o uso clínico dos produtos naturais, sendo necessário a avaliação da sua toxicidade pré-clínica para sua adequada utilização, dado que embora exista a exigência do Ministério da Saúde do Brasil para que haja a realização de testes de toxicidade para os fitoterápicos, incluindo da mutagenicidade e carcinogenicidade, nem sempre estas exigências são cumpridas (CRUZ, 2015).

Dados sobre a toxicidade genética dos produtos fitoterápicos ainda são mínimos se comparados à diversidade de medicamentos de origem vegetal que existem no mercado. No entanto, inúmeros estudos obtidos por intermédio dessas pesquisas têm apontado para os efeitos genotóxicos e mutagênicos de produtos oriundos de produtos vegetais (CRUZ, 2015).

Nas últimas três décadas, houve um grande desenvolvimento de diferentes metodologias e abordagens com o objetivo de avaliar os efeitos genotóxicos, mutagênicos e/ou cancerígenos de produtos farmacêuticos e químicos (SPONCHIADO *et al.*, 2016). Esses protocolos são baseados na correlação entre carcinogenicidade e mutagenicidade, bem como na correlação desses parâmetros com a genotoxicidade, conforme descrito por Sponchiado e colaboradores (2016).

A planta medicinal popularmente conhecida como cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllata*) é um exemplo dessa capacidade mutagênica. Estudos demonstraram que a mesma gerou mutação direta em cepas de *Escherichia coli* (CRUZ, 2015; SANTOS *et al.*, 2008). Além disso, destaca-se o óleo de coco (*Cocos nucifera*) que ao ser avaliado, também mostrou atividade mutagênica no teste de Ames (CRUZ, 2015; PETTA *et al.*, 2004).

De forma geral, os ensaios de genotoxicidade são empregados com a finalidade de identificar substâncias específicas que possuem a capacidade de interagir com o ácido desoxirribonucléico em baixas concentrações e, dessa maneira, gerar modificações de características hereditárias (LÁZARO *et al.*, 2010; SPONCHIADO *et al.*, 2016).

Um agente genotóxico, ao interagir com o ácido desoxirribonucleico (DNA), pode ocasionar aberrações cromossômicas e/ou alterações na estrutura do DNA que podem afetar a transcrição da mensagem e levar a alterações irreversíveis nas células. Essas modificações podem ser relacionadas ao desenvolvimento e/ou predisposição de doenças, aumento da mortalidade, mutações hereditárias e problemas na reprodução (LÁZARO *et al.*, 2010; SPONCHIADO *et al.*, 2016).

Portanto, as avaliações dos efeitos genotóxicos de um medicamento (sintético ou fitoterápico) são essenciais para garantir a segurança do consumidor. Para esse fim, é necessário selecionar métodos oficiais baseados em diretrizes internacionais e/ou agências regulatórias que sejam mais adequados aos objetivos, escopos e recursos financeiros, humanos e físicos disponíveis (BADERNA *et al.*, 2020).

O Teste de Micronúcleo em Células de Mamíferos *in vitro* (OECD 487) é um ensaio que possui uma extensa aplicação *in vitro*, no qual é reconhecido e validado pelo guia OECD 487 (2016). Destaca-se entre os ensaios de genotoxicidade, dado que é um protocolo simples, preciso e com ampla aplicabilidade, principalmente no desenvolvimento de novos fármacos (FLORES & YAMAGUCHI, 2008).

O laboratório de Toxicologia (ToxLab) da Faculdade de Farmácia da UFMG, local onde foi desenvolvido o projeto, possui expertise na avaliação da segurança de produtos farmacêuticos (fármacos naturais ou sintéticos), cosméticos, amostras ambientais e substâncias com potencial tóxico das mais diversas origens. Associado à Rede Nacional de Métodos Alternativos ao Uso de Animais (RENAMA) e especializado em testes de toxicidade *in vitro* de mutagenicidade (Teste de Ames) e genotoxicidade (Teste de Micronúcleo em Células de Mamíferos *in vitro*), testes baseados em diretrizes internacionais, OECD, e também por aquelas oriundas da Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA.

No presente projeto, avaliamos a segurança *in vitro* das formulações semissólidas sob a forma de gel, empregando o polímero carboxipolimetileno, contendo óleo de copaíba, para ser utilizada no tratamento tópico de feridas, com ação cicatrizante e anti-inflamatória, produto que está sendo desenvolvido e testado a eficácia por Instituições parceiras: Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Universidade Federal Fluminense (UFF), Instituto Federal do Rio de Janeiro (IFRJ), Universidade Estadual da Zona Oeste (UEZO), Instituto Militar de Engenharia (IME) e Instituto de Engenharia Nuclear (IEN). Os ensaios foram realizados em conformidade com o Sistema de Gestão da Qualidade (NBR ISO/IEC

17025:2005) e com a diretriz internacional da Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (Teste Micronúcleo em Células de Mamíferos *in vitro*) OECD 487.

1.1. Toxicidade de medicamentos fitoterápicos

Produtos oriundos de plantas medicinais, embora sejam amplamente considerados como seguros pelo senso comum (JORDAN *et al.*, 2009), existem inúmeros relatos na literatura de efeitos adversos associados à utilização dos mesmos (JAYASINGHE *et al.*, 2017). Portanto, torna-se extremamente necessário a realização de uma avaliação toxicológica adequada dos produtos fitoterápicos antes da sua utilização clínica (JAYASINGHE *et al.*, 2017).

Os estudos de segurança não-clínicos são excelentes ferramentas utilizadas no processo de desenvolvimento de fármacos, dado que através desses se torna possível a obtenção de respostas preditivas a respeito dos riscos, e com essas informações é exequível a redução dos eventos adversos nos seres humanos (SILVA *et al.*, 2021).

As análises da toxicidade pré-clínica podem ser realizadas *in vivo* e *in vitro*. Os modelos *in vivo* têm sido uma base para esses testes nos últimos anos, entretanto possuem como desvantagem o valor financeiro exacerbado, o alto grau de trabalho para a realização dos experimentos e, principalmente, a baixa preditividade e reprodutibilidade em humanos (FREIRES *et al.*, 2017).

O “Guia para a realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos” da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) foi escrito em conformidade com a Organização Mundial da Saúde (OMS) e com a Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD) no qual é possível observar quais são os testes necessários para a aprovação de um medicamento de origem natural no Brasil, e nele ainda nota-se a importância da realização de estudos especiais, como os testes de genotoxicidade e mutagenicidade, em produtos que possuem indicação de uso contínuo ou prolongado pelos pacientes, como será a formulação estudada neste trabalho.

1.2. Eficácia e segurança da *Copaifera ssp.*

O uso tradicional da Copaíba apresenta notoriedade em toda a América Latina, principalmente em nosso país. Destacando-se o norte e nordeste do Brasil, onde são descritas inúmeras ações etnofarmacológicas para a *Copaifera ssp.* como: propriedades anti-inflamatórias, estimulantes, anti-sépticas, antitetânicas, antirreumáticas, antiherpéticas, antihelmínticas, anticancerígenas e antitumorais (DA TRINDADE. *et al.*, 2018; JOYCE, *et al.* 2012; RIOS, 2011).

Nos Estados Unidos a Copaíba é aprovada pela *Food and Drug Administration* (FDA) para a utilização na indústria alimentícia como um aromatizante de bebidas e alimentos. Além disso, o óleo de *Copaifera* é utilizado mundialmente na indústria de cosméticos como fixador de aromas em perfumes e fragrâncias (DA TRINDADE. *et al.*, 2018; TAYLOR, 2005).

Existe uma gama de estudos que associam a planta medicinal Copaíba com atividades farmacológicas, principalmente associado com tratamento para inflamação e dor (MARTINI *et al.*, 2016; PAIVA *et al.*, 2002), atividade cicatrizante (MAGUTU, 2022; PAIVA *et al.*, 2002) e potencial antigenotóxico (ALVES, *et al.*, 2018).

Contudo, existem vários outros estudos que comprovaram efeitos tóxicos da copaíba, inclusive atividade genotóxica *in vitro* (ALVES, *et al.* 2017; CARDOSO, *et al.* 2017; CAVALCANTI, 2005; CAVALCANTI, *et al.* 2006; CAVALCANTI, *et al.* 2009) e *in vivo* (CHEN-CHEN & SENA, 2002).

Urasaki e colaboradores (2020a) e (2020b) demonstraram que o óleo de copaíba exerce funções na regulação do ciclo celular. Os resultados obtidos mostram que o β -cariofileno, principal fitoquímico do óleo essencial de copaíba, regula negativamente a via de sinalização p13K/Akt/mTOR e em conjunto, os resultados indicaram que o óleo essencial de copaíba regula as vias de sinalização associadas ao metabolismo celular, crescimento, imunidade e apoptose (Urasaki *et al.*, 2020b).

Realizamos uma revisão e análise crítica dos principais artigos que citam a segurança ou toxicidade genética da Copaíba. Um grande problema encontrado foi a não realização de estudos preliminares de citotoxicidade antes da execução dos ensaios de avaliação de genotoxicidade e/ou mutagenicidade e a ausência de estudos que realizassem os ensaios seguindo diretrizes internacionais (Apêndice B).

Deve ser ressaltado que os estudos como os realizados por Alves e colaboradores (2018) e Furtado *et. al.* (2018) que foram negativos *in vitro* para a evento genotóxico não mimetizaram a ação das enzimas da CYP450, através da ativação metabólica S9 (*mix* S9).

A forma farmacêutica do produto à base de plantas medicinais também deve ser levada em consideração. A concentração de fitoquímicos no óleo é diferente daquelas obtidas no chá e ou extrato da planta medicinal (CANELHAS, 2012). Portanto, resultados que demonstraram segurança genética como o descrito por Pavan *et al.* (2018), que testou a atividade genotóxica do chá de copaíba e Damasceno e autores, que avaliaram a toxicidade dos extratos da *Copaifera*, devem ser extrapolados com muita cautela para outras apresentações fitoterápicas da mesma droga vegetal, principalmente se for em uma espécie diferente.

A variação química entre as espécies é extremamente importante para a determinação da dose segura de utilização para os seres humanos. Dado que o ácido copálico é o único composto fitoquímico encontrado em todas as espécies de copaíba, por esta razão, o mesmo pode ser considerado um biomarcador das espécies do gênero *Copaifera* (PINTO *et al.*, 2000; VEIGA, 2004).

Entre os outros fitoquímicos, destaca-se o ácido caurenóico, devido ao seu possível potencial genotóxico e citotóxico. O estudo realizado por Cardoso *et al.* (2017) demonstrou que o ácido caurenóico tem potencial genotóxico especialmente em concentrações mais altas, evidenciado pelo aumento das frequências de micronúcleos (*in vitro*) e danos no DNA, pelo ensaio cometa. Esse diterpeno também foi relacionado com uma capacidade hemolítica e antiproliferativa *in vitro* em uma relação dose/resposta por Costa-Lotufo *et al.* (2002).

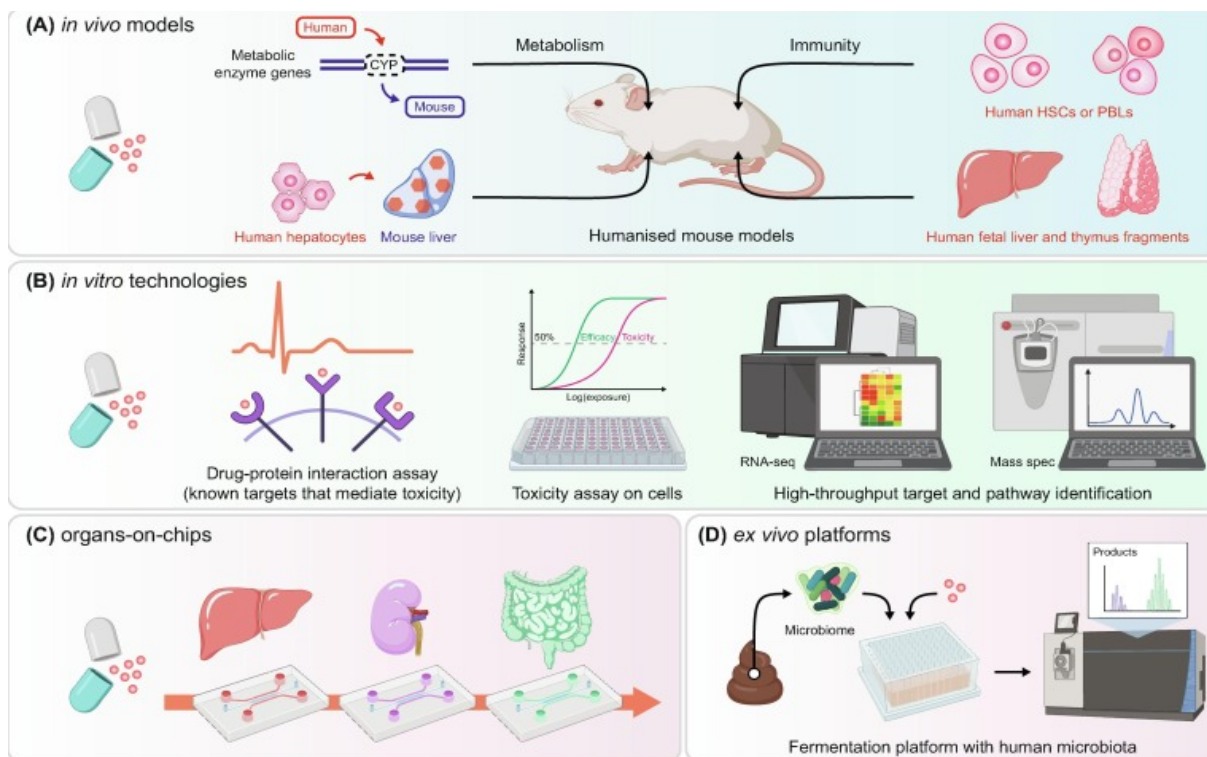
1.3. Modelos de experimentação *in vivo* e *in vitro*

Atualmente, a ciência se dispõe de uma variedade de modelos experimentais, sendo os mesmos *in vivo*, *in vitro*, *in silico*, plataformas *ex vivo* e na ponta da inovação encontra-se os *organ-on-chips* (Figura 2), que são sistemas micro fisiológicos que emergiram como possível solução para desafios apresentados nas tecnologias *in vitro* e em modelos de experimentação em animais (CHI, BURROWS & ANDERSON, 2022).

Entretanto, todos esses modelos apresentam limitações e vantagens de utilização, por exemplo: Modelos de experimentação em animais são onerosos, trabalhosos e podem gerar

resultados nem sempre preditivos e reproduzíveis em humanos e trazem uma controvérsia histórica suscitando dilemas sociais e éticos (FREIRES *et al.*, 2016; KIM *et al.*, 2019).

Figura 2. Modelos experimentais científicos



Fonte: Chi, Burrows & Anderson. (2022). Principais modelos experimentais usados: A. *In vivo*, representado pelo modelo de camundongos; B. *In vitro*, cultura de células que são usadas rotineiramente para testar o perfil de segurança da terapêutica; C. *Organs-on-chip*, que são novos sistemas que podem ser usados para prever a toxicidade terapêutica específica para humanos e órgãos; D. *ex vivo*, plataformas muito utilizadas para elucidar a toxicidade de drogas mediada por microbioma.

Por outro lado, nota-se que embora os testes *in vitro* sejam de grande importância na exclusão de candidatos a fármacos com alta toxicidade, apresentam uma grande limitação quanto ao poder preditivo da fisiologia humana, visto o ambiente e condições diferentes. Muitas substâncias acabam passando por esses testes e, na sequência, com novos ensaios, são descartadas por apresentarem propriedades nocivas ou não adequadas, que não apareceram nos testes *in vitro* (GENTILE, 2016).

Os *organs-on-chip*, no presente momento, apresentam como desvantagens o elevado custo de fabricação e implementação experimental, fator que não favorece o uso generalizado de fragmentos de órgãos e a popularização da técnica (WU *et al.*, 2020).

Entre os modelos mais utilizados ao longo dos séculos destaca-se o *in vivo*, por isso é importante que seja entendido seu contexto histórico ao longo dos séculos. A utilização de animais na pesquisa científica é datada desde a antiguidade. Primeiro relato é de 500 anos antes de Cristo (a.C.) por Hipócrates, "pai da Medicina", que comparava os órgãos humanos com os dos animais (GUIMARÃES *et al.*, 2016).

Alguns séculos depois a utilização de animais para fins científicos se tornou ainda mais evidente, principalmente por filósofos como Aristóteles (300 anos a.C.) que defendia a superioridade dos humanos em detrimento dos outros seres vivos. Para ele a hierarquia se baseava na racionalização, portanto um poderia dominar o outro (GUIMARÃES *et al.*, 2016).

Essas teorias se tornaram mais fortes ao longo dos séculos, gerando o primeiro relato de vivissecção, por Galeno (130-200 d.C.) (GUIMARÃES *et al.*, 2016; SILVA, 2008). Prática que apresenta uma dualidade e grande debate se pode ser considerada crueldade ou ciência necessária, dado que, os animais são dessecados ainda vivos para observar o funcionamento dos órgãos e as variáveis.

No século XVIII, o Iluminismo e o Renascimento com os ideais do Antropocentrismo (filosofia que atribui ao ser humano a centralidade em relação a todo o universo) consolidaram ainda mais a ideia de que todas as coisas existentes deveriam servir à espécie humana. Esse conceito contribuiu fortemente para a sustentação da experimentação animal como método padrão de investigação científica e de finalidade didática na medicina ao longo dos séculos (GUIMARÃES *et al.*, 2016; SILVA, 2008).

Destaque nesta época para René Descartes que fundamentou a teoria mecanicista que tratava os animais como simples modelos mecânicos, isto é, sem espírito e sem dor. Portanto, seria aceitável qualquer tipo de procedimento (SILVA, 2008).

Apenas em 1789 o termo de bioética foi instaurado, por Jeremy Bentham que lançou a base para os princípios morais e éticos para experimentação animal. Em termos de legislação, a Inglaterra foi o primeiro país a regulamentar a questão anticrueldade em 1822, mas uma lei segregacionista à ética que enquadrava apenas animais domésticos de grande porte (SILVA, 2008).

Ao longo dos séculos as idéias mecanicistas e antropocêntricas foram caindo em desuso, fomentando espaço para leis que visavam o bem-estar animal e a segurança humana (SILVA, 2008). Importante destacar a Lei Federal nº 11.794/08 (Lei Arouca) que regulamenta o inciso VII do § 1º do art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais em solo brasileiro (BRASIL, 2008).

Nas últimas décadas, os métodos alternativos em relação à utilização de animais têm ganhado espaço, baseado no princípio dos 3R's (*Reduction, Refinement, Replacement*), redução, refinamento e substituição (CAZARIN *et al.*, 2004). Os métodos *in vitro* têm se desenvolvido em decorrência da coerção social para a redução do número de animais usados nas pesquisas científicas e pelo seus benefícios como: menor custo monetário e respostas preditivas (SILVA *et al.*, 2021). Destaca-se que muitos destes métodos já são validados e aceitos por órgãos regulatórios como metodologias para avaliação de segurança de produtos, inclusive para produtos fitoterápicos (BRASIL, 2004).

1.5.1. Valor preditivo

Apesar da forte contribuição dos modelos animais para a evolução da ciência e do desenvolvimento de novos medicamentos, o valor preditivo dos animais é considerado baixo (HACKMAN & REDELMEIER, 2006; LOW, *et al.*, 2021; MAK & GHERT, 2014). A frequente discordância entre estudos em animais e humanos têm demonstrado uma necessidade de plataformas de modelagem e testes que sejam mais preditivos das respostas humanas (LOW, *et al.* 2021).

O que acontece em animais não irá ocorrer necessariamente em humanos. Uma revisão, realizada em 2006 por de Hackman e Redelmeier, utilizando mais de 60 estudos com animais altamente citados nos principais periódicos entre 1980 e 2000 demonstrou que apenas um terço dos produtos farmacêuticos aprovados *in vivo* são convertidos para estudos em humanos.

Principalmente em oncologia, embora o genoma de camundongos de humanos sejam similares, já é fundamentado na literatura que a correlação é baixa, em torno de 67% (HACKMAN & REDELMEIER, 2006). Mak & Ghert (2014) afirmam que a taxa média de tradução bem-sucedida de pesquisas *in vivo* relacionadas ao câncer para ensaios clínicos em humanos é em torno de 8%.

Seok e colaboradores (2013) relataram que os modelos de camundongos usados extensivamente para estudar doenças inflamatórias humanas não são preditivos. O estudo descobriu que a resposta inflamatória dos camundongos se diferem muito dos humanos (SEOK, *et al.*2013)

Low e colaboradores (2021) abordam a respeito da translação dos modelos e seus impactos no desenvolvimento de um novo fármaco. Os pesquisadores afirmam que a

comunidade científica já está ciente da fragilidade dos modelos experimentais que são utilizados e apesar do massivo desenvolvimento em biologia computacional e *in vitro* nos últimos 20 anos, atualmente mais de 80% dos medicamentos experimentais falham em testes realizados com seres humanos, com 60% dessas falhas devido à falta de eficácia e outros 30% devido à toxicidade.

A indústria farmacêutica enfrenta uma queda de produtividade devido a este cenário. Nas últimas décadas, a indústria tentou contornar este desafio testando um grande número de compostos, isso foi possível em virtude da evolução da modelagem molecular de fármacos (*in silico*) baseado em alvo terapêuticos (KRAMER, SAGARTZ & MORRIS, 2007).

Porém, numerosos indicadores apontaram para uma diminuição da produtividade na indústria farmacêutica apesar do aumento dos investimentos. A falha descrita na década de 1980 é correlacionada com a farmacocinética e biodisponibilidade dos possíveis fármacos aprovados na triagem *in silico*. Ou seja, ao invés de entregar um aumento no sucesso de candidatos ao desenvolvimento clínico, o efeito imediato foi um aumento de reprovações, dado que apenas um modelo ainda não é suficiente para prever completamente a resposta em outros cenários (KRAMER, SAGARTZ & MORRIS, 2007).

Em 1990, com a evolução dos equipamentos de análise químicas como o espectrofotômetro de massas e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e cooperação da modelagem molecular, a indústria conseguiu contornar os desafios relacionados à farmacocinética. Contudo, juntamente com a melhoria das exposições sistêmicas vieram as observações aumentadas de toxicidade limitante do desenvolvimento. Na última década a toxicidade demonstrou ser a principal causa de falhas em todas as fases do desenvolvimento de drogas (KRAMER, SAGARTZ & MORRIS, 2007).

Kramer, Sagartz & Morris (2007) afirmam que, aproximadamente 25% das falhas da fase II, 14% das falhas da fase III e 31% das falhas de novos medicamentos ou pedidos de licença biológica são devidos a questões de segurança. Não obstante, anualmente o número de eventos adversos graves associados ao uso de medicamentos aprovados está crescendo constantemente ao longo do tempo.

Portanto, é essencial que ocorra um aperfeiçoamento da precisão da avaliação de segurança, para que fármacos e fitoterápicos que apresentem perfis de segurança insatisfatórios possam falhar precocemente, minimizando assim o risco para os participantes e pacientes do estudo e permitindo o redirecionamento de recursos valiosos (KRAMER, SAGARTZ & MORRIS, 2007).

1.5.2. Métodos Alternativos ao uso de animais

Fundamentada em 1959 por Russell e Burch no livro "*The Principles of Humane Experimental Technique*", a ciência dos métodos alternativos é uma disciplina aplicada que visa melhorar o tratamento dos animais utilizados como modelos experimentais nos laboratórios, ao mesmo tempo em que busca avançar na qualidade dos resultados obtidos pela ciência (RUSSELL & BURCH, 1959).

Isso significa que os métodos alternativos são aqueles que, sem utilizar diretamente animais (ou utilizando poucos animais), fornecem informações equivalentes às obtidas com o uso de animais de experimentação completos. Isso resulta na redução do número de animais utilizados ou no uso de procedimentos menos dolorosos (ARAÚJO *et al.*, 2014).

Entretanto, como elucidado por Araújo e colaboradores (2014), os ensaios *in vitro* decorrentes dos métodos alternativos não são baseados apenas em uma questão ética, mas sim na busca por uma maior capacidade preditiva dos métodos. Dessa forma, é possível identificar biomarcadores precoces de eventos adversos e doenças.

As principais vantagens da utilização dos métodos alternativos ao uso de animais são: maior controle das condições experimentais, redução da variabilidade individual, economia de recursos financeiros e de tempo, bioética (redução, refinamento e substituição da utilização de animais) e possibilidade de estudar os compostos em células vivas e humanas (ARAÚJO *et al.*, 2014; ROBINSON, *et al.*, 2019)

Contudo, como limitações das técnicas temos: dificuldade de extrapolação dos resultados, impossibilidade de avaliar efeitos no comportamento, de cinética e toxicidade crônica (ARAÚJO *et al.*, 2014; ROBINSON, *et al.*, 2019).

No subtópico a seguir, será apresentada a principal técnica empregada nas metodologias alternativas ao uso de animais em pesquisa científica: a cultura celular de mamíferos e humanos.

1.5.2.1 Cultura celular

Linhagens celulares imortalizadas ou contínuas são ferramentas padronizadas e bem estabelecidas na comunidade científica para ensaios biológicos e médicos. Para isso, é essencial que exista um microambiente artificial para as células cultivadas, composto por

fatores bem mensurados e avaliados, incluindo citocinas, meios de cultura adequados, interações célula-célula e estresse físico (AOKI, *et. al.*, 2016).

Além disso, para garantir resultados significativos e reprodutíveis, é um pré-requisito uma boa prática de cultura de células (GERAGHTY *et al.*, 2014). Devido à crescente dependência de conjuntos de dados publicados, é necessário que a fonte dos dados (culturas celulares) seja confiável. Entretanto, infelizmente, muitas vezes práticas de laboratório inadequadas, como contaminação cruzada, contaminação por micoplasma ou rotulagem incorreta, resultam em linhagens celulares mal identificadas que não correspondem mais à fonte original (BAUST, *et. al.* 2017; SOUREN, *et. al.* 2022).

Uma constatação desse problema foi descrita inicialmente em 1968 por Stanley Gartler, que identificou linhagens celulares mal identificadas e publicou que 19 linhagens celulares humanas supostamente independentes eram, na verdade, células HeLa (GARTLER, 1968; SOUREN, *et. al.* 2022).

O principal fator contribuinte para esses erros é o compartilhamento de materiais biológicos entre laboratórios, uma prática ainda comum na comunidade científica que possui grande relevância para a perda de confiabilidade em estudos com culturas de células, como descrito por Migita (2012).

Outrossim, alguns autores como Carias (2017) afirmaram que um outro problema relacionado aos erros e a falta da reprodutibilidade dos lotes de células obtidas é devido às variações de execução dos protocolos originais e não apenas às características do próprio material de origem das células.

Souren e colaboradores (2022) afirmaram que 4% dos artigos são rejeitados devido a problemas graves relacionados às linhagens celulares. Além das questões de autenticação celular, também é evidente a importância das boas práticas assépticas, especialmente para a detecção de micoplasmas (*Mycoplasma hominis*), para assegurar a fidedignidade dos resultados obtidos e as conclusões geradas nos estudos.

Testes regulares de contaminação e autenticação são necessários para evitar consequências negativas de culturas celulares contaminadas e mal identificadas e devem ser considerados como controle de qualidade de linhagens celulares em biobancos e sempre que possível na Academia (CORRAL-VÁZQUEZ, *et. al.* 2017).

A adequação do tipo de linhagem para o estudo desejado é fundamental para a obtenção de resultados robustos. Em relação aos parâmetros de avaliação de genotoxicidade, a linhagem de fibroblasto oriunda de pulmão de hamster V79 possui interessantes propriedades

para ensaios deste fim, como por exemplo: baixa frequência de mutação genética, fácil cultivo e manutenção, rápido crescimento e curto período de adaptação (BRADLEY, *et. al.*, 1981, DANTAS, 2018; ROSA, 2008).

Contudo, essa linhagem não é competente para ativação metabólica, portanto para a análise de genotoxicidade e/ou mutação nas células V79-4 é necessário que o teste ocorra concomitantemente ao metabolismo exógeno por homogeneizados celulares, geralmente fração S9, ou por cocultura com células hepáticas (BRADLEY, *et. al.*, 1981).

1.5.2.1 Ativação metabólica in vitro

O metabolismo é um processo biológico essencial que transforma alimentos em energia, ativa medicamentos e principalmente elimina compostos de toxinas do corpo. Durante o processo de metabolização, são gerados metabólitos com maior ou menor atividade de ativação ou desativação em relação ao composto original (OOKA, LYNCH & XIA, 2020).

Devido à importância biológica, há uma grande necessidade de métodos de triagem mais eficientes e confiáveis para analisar a toxicidade de cada composto, inclusive uma possível toxicidade oriunda dos metabólitos gerados. Para tal investigação, como os metabólitos agem dentro do organismos, as metodologias de triagem requerem métodos de metabolismo *in vitro* (OOKA, LYNCH & XIA, 2020).

O metabolismo hepático pode ser dividido em fases I e/ou II, sendo que as enzimas da fase I participam da oxidação, redução e hidrólise, e são as grandes responsáveis por ativar ou inativar uma molécula original, conseqüentemente possuem maior interesse das análises toxicológicas (OOKA, LYNCH & XIA, 2020). Entre essas destacam-se as enzimas do citocromo P450 (CYP450) que desempenham um papel essencial na fase I do metabolismo de drogas e são responsáveis por aproximadamente 75% do metabolismo total de moléculas pequenas (GUENGERICH, 2008; OOKA, LYNCH & XIA, 2020).

O fígado é o principal responsável pela metabolização, portanto os hepatócitos expressam uma abundância de enzimas CYP e demonstram a maior capacidade de biotransformação de xenobióticos de fase I (OOKA, LYNCH & XIA, 2020).

As CYPs estão intimamente ligadas à genotoxicidade e/ou carcinogenicidade de alguns compostos. Abu-Bakar e autores (2022) afirmaram que essas enzimas estão envolvidas na ativação de diferentes produtos químicos cancerígenos no ambiente, como hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e nitrosaminas relacionadas ao tabaco. Dado que, intermediários

eletrofilicos produzidos a partir desses produtos químicos podem se ligar covalentemente ao DNA, induzindo mutação e transformação celular que resultam coletivamente no desenvolvimento do câncer.

Ao longo do tempo, foram desenvolvidas diversas técnicas de metabolismo *in vitro* para simular o organismo humano, devido à importância da influência dos metabólitos na eficácia e segurança de produtos químicos e naturais (OOKA, LYNCH & XIA, 2020). Com base no objetivo do ensaio e na técnica empregada na triagem, existem diversas opções no mercado que podem adicionar capacidade metabólica no modelo experimental escolhido.

O modelo exógeno de metabolização mais utilizado e recomendado pelas diretrizes internacionais como a OECD é a fração S9. Essa fração é obtida a partir do fígado de roedores tratados com agentes indutores e é uma fração pós-mitocondrial (Aroclor 1254) de enzimas do sistema CYP450, acrescentada de cofatores (DANTAS, 2018; KRANENDONK *et al.*, 2000; OECD 487, 2014).

Neste trabalho foi utilizada a fração S9 de fígado de rato e para a comparação dos resultados gerados, também foi utilizado uma linhagem de hepatoma estabelecida, HepG2, para a realização de ensaios individuais. Derivada de um homem jovem (15 anos) caucasiano, as células HepG2 são uma alternativa confiável aos hepatócitos humanos e são amplamente utilizadas para estudos de toxicidade e metabolismo de fármacos e fitoterápicos (OOKA, LYNCH & XIA, 2020; TOMPKINS, *et al.* 2010)

Baseado no que foi descrito por Bigger, Dipple & Lake (1980), podem ocorrer diferenças importantes na ativação metabólica de uma substância entre sistemas celulares intactos, ou seja, em células competentes para metabolização hepática, e em homogeneizados de fígado em ensaios de curto prazo para agentes genotóxicos e/ou carcinógenos. Essas diferenças podem levar a resultados enganosos.

1.5.2.1.1 Paridade entre o mix S9 murino e hepatócitos humanos

Os resultados dos estudos de carcinogenicidade animal são considerados o "padrão ouro" para validar os sistemas de teste *in vitro*. No entanto, os dados gerados em modelos murinos frequentemente apresentam discordâncias. É importante destacar que diferenças ainda maiores podem ser esperadas em relação aos seres humanos, que são uma espécie filogeneticamente distante (KU *et al.*, 2007)

Ku e autores (2007) explicam que a biotransformação geralmente é a grande responsável por esta dependência de espécies de carcinogenicidade. Dado que, as enzimas ortólogas expressas por genes de diferentes espécies demonstram diferenças pronunciadas na especificidade do substrato e do produto. Da mesma forma, podem diferir substancialmente em sua regulação e distribuição tecidual.

O S9 de fígado de rato induzido, essencialmente, é utilizado como uma “fábrica de metabólitos” nos testes de micronúcleo *in vitro* e teste de Ames (KU *et al.*, 2007). Sendo amplamente utilizado pelos órgãos regulatórios devido aos níveis elevados de diversas enzimas CYP após a indução, especialmente as enzimas da subfamília CYP1A (CYP1A1 e 1A2), que são eficientes na bioativação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, azaarenos, aminas aromáticas e aflatoxinas (agentes mutagênicos após ativação metabólica) (KU *et al.*, 2007; OOKA, LYNCH & XIA, 2020).

É padronizado mundialmente por fornecer um sistema de ativação metabólica confiável, robusto e prontamente disponível. Além disso, é mais fácil padronizar um sistema murino em comparação com um sistema exógeno humano, uma vez que o último normalmente requer amostras de tecido humano que estão sujeitas a variações biológicas significativas (KU *et al.*, 2007).

1.4. Análise *in vitro* para toxicidade genética

A avaliação da toxicidade genética é o ramo da toxicologia que estuda a segurança de agentes e substâncias em relação ao DNA e a danos cromossômicos nas células devido a potenciais agentes ou substâncias (CHOUDHURI *et al.* 2021).

Os testes de toxicologia genética tornaram-se um requisito regulamentar para todos os novos medicamentos e muitos outros materiais em todos os países desenvolvidos ao redor do mundo. Isso ocorreu devido à grande preocupação pública em relação à carcinogenicidade e aos efeitos hereditários de substâncias amplamente utilizadas no dia-a-dia (TURKEZ, ARSLAN & OZDEMIR, 2017).

A avaliação do potencial genotóxico para humanos segue atualmente uma abordagem gradual, começando com uma bateria básica de testes *in vitro* seguida, em alguns casos, por testes *in vivo*, sendo que os requisitos regulamentares variam dependendo do tipo de produto

químico sob regulamentação e da região (CORVI & MADIA, 2017; TURKEZ, ARSLAN & OZDEMIR, 2017).

Um exemplo disso, é a proibição de testes *in vivo* para cosméticos na União Europeia e diversos outros países, como Brasil. Por outro lado, para produtos químicos industriais e biocidas, um resultado positivo em um ou mais dos testes de genotoxicidade *in vitro* requer confirmação por meio de testes *in vivo* de acompanhamento apropriados nestes mesmos Estados (CORVI & MADIA, 2017).

Em relação a regulamentação dos fitoterápicos no Brasil, é recomendado pela ANVISA que se inicie os experimentos pelo Teste de Ames e, em casos positivos, deverá submeter a amostra a um ensaio que utiliza células de mamíferos, positivando novamente não é necessário realizar novos testes. Contudo, em episódios positivos para o Teste de Ames e negativos para células de mamíferos, o resultado final carece de estudos *in vivo* (micronúcleo em roedores) (ANVISA, 2019).

1.4.1 Genotoxicidade

Genotoxicidade é um termo utilizado para classificar substâncias que possuem efeitos destrutivos no material genético de uma célula (DNA, ácido ribonucleico (RNA)), afetando assim a integridade da célula (CHOUDHURI *et al.*, 2021; CORVI & MADIA, 2017).

Choudhuri e autores (2021) abordaram que se esses danos gerados no DNA ocorrerem em células somáticas podem levar ao desenvolvimento de câncer, enquanto se o dano for associado às células germinativas pode ser responsável por mutações hereditárias que permitem defeitos congênitos em organismos eucarióticos.

Atualmente, o conhecimento e/ou as intervenções em eventos genotóxicos estão sendo considerados como novos caminhos para o manejo e profilaxia de patologias, dado que, os danos no DNA mitocondrial e nuclear estão associados a distúrbios neurodegenerativos, incluindo ataxias juntamente com doença de *Alzheimer*, *Huntington* e *Parkinson*. Além disso, os danos no DNA desempenham um papel causal em outras numerosas doenças humanas como: infertilidade, cardiopatias, envelhecimento prematuro, disfunção de células-tronco, condições inflamatórias crônicas e síndromes metabólicas (TURKEZ, ARSLAN & OZDEMIR, 2017).

Analisar a genotoxicidade humana é um componente necessário e crítico das medidas de saúde pública no cenário atual, principalmente no âmbito de desenvolvimento de novos

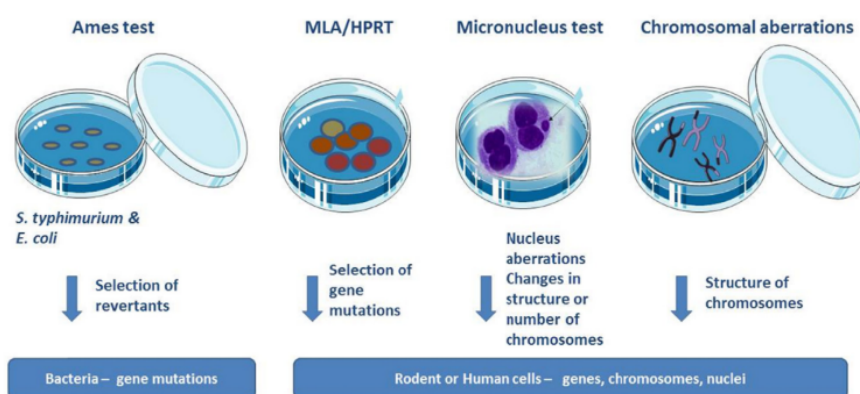
fármacos e fitoterápicos (CHOUDHURI *et al.*, 2021; CORVI & MADIA, 2017; TURKEZ, ARSLAN & OZDEMIR, 2017).

Portanto, para uma abordagem bem-sucedida no estudo de toxicidade genética, é necessário seguir um processo que inclua uma variedade de ensaios *in vitro* bem estabelecidos e, em alguns casos, ensaios *in vivo*. Em relação à genotoxicidade, é recomendado que os testes escolhidos abordem três aspectos principais: mutação genética, aberrações cromossômicas estruturais e numéricas. Cada um desses eventos está associado à carcinogênese e a doenças hereditárias (CHOUDHURI *et al.*, 2021; CORVI & MADIA, 2017).

A sequência de teste *in vitro* padrão compreende o ensaio de mutação reversa bacteriana, Teste de Ames (OECD 471), o teste *in vitro* de aberração cromossômica em mamíferos (OECD 473), o teste *in vitro* de mutação genética em células de mamíferos (OECD 476 [Hprt] e 490 [MLA/tk]) e o teste *in vitro* de micronúcleos de células de mamíferos (OECD 487), exemplificado na (Figura 3). (CORVI & MADIA, 2017).

O mais aceito para avaliação da segurança genética entre as agências regulatórias dos países, inclusive no Brasil, é a adoção do Teste de Ames (OECD 471) e teste *in vitro* de micronúcleos de células de mamíferos (OECD 487), por alcançar os três *endpoints* necessários (ANVISA, 2019).

Figura 3. Bateria de testes *in vitro*.



Fonte: (Corvi & Madia, 2017). Principais testes *in vitro*: Teste de Ames, detecção de substâncias mutagênicas em cepas de bactérias; MLA, teste de mutagenicidade realizado em células de mamíferos; Teste de Micronúcleo *in vitro*, avaliação da capacidade genotóxica de substâncias em linhagens celulares e Teste de Aberração Cromossômica, análise de eventos genotóxicos na estrutura dos cromossomos celulares.

1.4.1.1 Micronúcleo *in vitro*

Micronúcleos (MN) são pequenas estruturas semelhantes a núcleos formadas em células eucarióticas devido à deposição de envelope nuclear em torno de cromossomos inteiros atrasados em relação aos demais (aneugênicos) e fragmentos de cromossomos (clastogênicos) que não foram reincorporados a um núcleo primário durante a conclusão da mitose ou meiose e persistem na interfase (KRUPINA, GOGINASHVILI & CLEVELAND, 2021; KISURINA-EVGENIEVA, SUTIAGINA, & ONISHCHENKO, 2016).

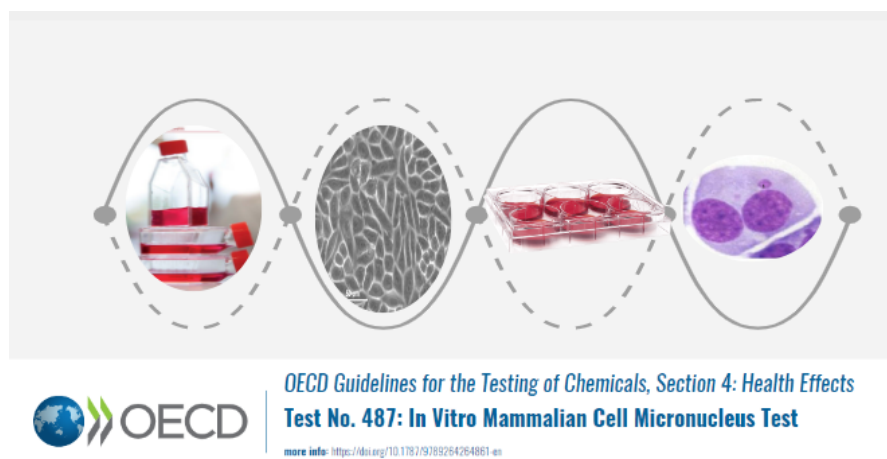
Essas pequenas estruturas possuem uma grande importância biológica, dado que o acúmulo de MN tem sido amplamente utilizado como um biomarcador de estresse genotóxico e instabilidade genética em uma grande variedade de modelos humanos e não humanos (KRUPINA, GOGINASHVILI & CLEVELAND, 2021).

A biogênese dos micronúcleos está relacionada à resposta celular a diversas influências negativas ao genoma, indicando lesões cromossômicas, como quebras ou alterações estruturais. Além disso, é amplamente descrito na literatura que uma frequência aumentada de micronúcleos está associada a diversas doenças, como câncer, doenças autoimunes e síndrome do envelhecimento precoce (KISURINA-EVGENIEVA, SUTIAGINA, & ONISHCHENKO, 2016).

O teste de micronúcleos *in vitro* é um método de genotoxicidade utilizado para determinar se uma substância pura ou uma mistura é capaz de causar danos cromossômicos induzidos por agentes aneugênicos e clastogênicos, através da formação de micronúcleos. Esse teste permite avaliar o potencial carcinogênico de substâncias de forma mais rápida e econômica do que os testes de carcinogenicidade *in vivo*, que envolvem estudos de longo prazo em roedores, com duração de 24 meses, sendo custosos tanto financeiramente quanto em termos de tempo de execução (BARBEZAN, 2017; OECD 487, 2016).

A metodologia é preconizada e aceita em diretrizes internacionais, como OECD 487 e a ISO 21427-2:2006(E), e está alinhada com o princípio dos 3R's. Habitualmente, o teste de MN *in vitro* em mamíferos é realizado com a linhagem celular V79-4 (fibroblastos pulmonares de Hamster Chinês) na presença e ausência de sistema de ativação metabólica de mamíferos *in vitro*. Com isso, é possível avaliar a genotoxicidade tanto das substâncias avaliadas quanto de seus metabólitos (Figura 4) (FLORES & YAMAGUCHI, 2008, OECD 487, 2016).

Figura 4. Teste de micronúcleo *in vitro*



O teste de micronúcleos in vitro é um teste de genotoxicidade para a detecção de micronúcleos no citoplasma de células em interfase.

1.5 Citotoxicidade e morte celular no contexto da genotoxicidade

O DNA é suscetível a vários tipos de genotoxinas e carcinógenos. Para mitigar a instabilidade genômica, as células possuem vias e proteínas de reparo do DNA, que visam remover ou tolerar as lesões. No entanto, danos não reparados podem ser tóxicos, desencadeando vias de eliminação celular, como apoptose e necrose, como uma resposta biológica para lidar com o dano genotóxico (ROOS, THOMAS & KAINA, 2016).

Morte celular, após a ocorrência de uma lesão no material genético, é um processo regulado por fatores pró-sobrevivência *versus* fatores pró-morte. Os pontos de checagem são os principais mecanismos pelos quais uma célula pode responder a danos no DNA, seja parando ativamente o ciclo celular ou por indução de apoptose (Levy *et al.* 2011; ROOS, THOMAS & KAINA, 2016).

Em relação à genotoxicidade, é extremamente necessário que se tenha cautela ao analisar resultados oriundos de uma amostra citotóxica, principalmente quando o mecanismo de morte celular predominante é apoptose. Meintières e autores (2001) descreveram que a apoptose pode ser um fator de confusão em ensaios clastogênicos *in vitro*, dado que esse mecanismo pode levar a uma superestimação do potencial genotóxico dos produtos químicos.

Além disso, há evidências de que os micronúcleos podem desencadear a apoptose, embora seja difícil determinar se os micronúcleos causam apoptose ou se células fortemente danificadas tendem a formar micronúcleos como resultado da citotoxicidade (REIMANN, *et al.* 2020).

Estudos demonstram que a apoptose causada por condições extremas na cultura celular, como variação de pH, osmolaridade ou força iônica, pode induzir a formação de células micronucleadas, o que pode levar a resultados falso-positivos no teste de micronúcleo *in vitro* (MEINTIÈRES & MARZIN, 2004; REIMANN, *et al.* 2020).

Pesquisas mecanísticas relacionadas aos micronúcleos revelaram que a diminuição da apoptose não pode ser associada a um aumento na indução de micronúcleos, sugerindo uma relação mais complicada entre apoptose e frequência de micronúcleos do que o esperado (REIMANN, *et al.* 2020).

Portanto, a viabilidade celular é crucial para a avaliação de micronúcleos. Para substâncias citotóxicas, a maior concentração de teste é baseada no perfil de toxicidade, por isso visa atingir $55 \pm 5\%$ de citotoxicidade usando os parâmetros de citotoxicidade recomendados e demais concentrações não deverão apresentar citotoxicidade, lembrando de tomar cuidado na interpretação de resultados positivos encontrados apenas na extremidade superior desta faixa de citotoxicidade (AARDEMA, *et. al.*, 2011)

1.6. Boas Práticas Laboratoriais Aplicadas à Avaliação da Segurança

Os laboratórios que realizam ensaios de segurança devem seguir as Boas Práticas de Laboratório (BPL). Erros relacionados à BPL são as principais causas de falta de reprodutibilidade de resultados científicos e, muitas vezes, da inviabilidade de transferência das pesquisas para serviços ou produtos biotecnológicos (CARIAS, 2017).

Freedman, Cockburn & Simcoe (2015) relataram em seu trabalho que apenas nos EUA foi estimado o investimento de 28 bilhões de dólares anuais em estudos falhos da área biomédica, com base em estudos prévios, nos quais cinco grandes grupos foram contratados para reproduzir publicações pré-clínicas e obtiveram resultado de falta de reprodutibilidade em 51% (n=80) pela Glasziou, 51% (n=257) pela Hartshorne and Scachner, 54% (n=238) pela Vasilevsky, 78% (n=67) pela Bayer Healthcare e 89% (n=53) pela Amgen (CARIAS, 2017; FREEDMAN, COCKBURN & SIMCOE, 2015).

Portanto, este estudo foi realizado seguindo todas as normas de BPL e alinhadas ao sistema de gestão da qualidade do ToxLab, laboratório da condução dos experimentos, que estão descritos no subtópico abaixo.

1.6.1 Sistema de Gestão da Qualidade (NBR ISO/IEC 17025:2005)

O laboratório de Toxicologia (ToxLab) da Faculdade de Farmácia da UFMG implementou o Sistema de Gestão da Qualidade (SGQ) a partir das diretrizes da ISO 17025 – Requisitos Gerais para Competência de Laboratórios de Ensaio e Calibração, ainda que não seja acreditado na mesma.

Na área gerencial, o ToxLab mantém POPs para manejo de informações confidenciais, aquisição de suprimentos e avaliação de fornecedores, controle de não conformidades, ações corretivas e preventivas, mantendo formulários para acompanhamento e registro dos itens mencionados. O ToxLab faz controle de versão dos POPs, instruções de trabalho e formulários, tanto da área gerencial como da área técnica. Além disso, realiza treinamentos de pessoal de acordo com a demanda do laboratório, incluindo treinamentos técnicos e relacionados ao SGQ.

É rotina laboratorial a escrita de toda documentação para padronização e rastreio dos ensaios realizados, com procedimentos operacionais padronizados (POPs), formulários e mapas de trabalho. Para a realização desta dissertação foram desenvolvidos todos os documentos e POPs necessários.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

- ✓ Avaliar a segurança do óleo resina de *Copaifera multijuga* Hayne e uma formulação fitoterápica semissólida sob forma de géis contendo óleo.

2.2. Objetivos específicos

- ✓ Realizar estudo de citotoxicidade nas linhagens (V79-4) e (HepG2) e comparar se existe influência da ativação metabólica na morte celular gerada pela amostra;
- ✓ Avaliar o potencial genotóxico utilizando a diretriz OECD 487 (Teste Micronúcleo em Células de Mamíferos *in vitro*) em células murinas (V79-4) e em células humanas competentes para metabolização hepática (HepG2);
- ✓ Analisar a capacidade do óleo resina de *Copaifera multijuga* Hayne e hidrogel polimérico de induzir danos no DNA e/ou alterar o ciclo celular da linhagem celular V79-4, na presença e ausência de ativação metabólica, utilizando citometria de fluxo.
- ✓ Observar se existe correspondência entre a possível fragmentação de DNA notada na citometria de fluxo e na frequência de micronúcleos.
- ✓ Estimar os mecanismos de morte celular e comparar se existe diferença na presença e ausência de metabolização hepática.

3. ARTIGO

Nota explicativa

Conforme orientações do programa de Pós Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas, a dissertação de mestrado deve conter um artigo técnico-científico a ser submetido em revista indexada no formato e com as normas a serem submetidas.

Artigo a ser submetido para publicação na revista: Food and Chemical Toxicology (fator de impacto 5.572), intitulado: **“Copaiba oil-resin generates cytotoxic and genotoxic hepatic metabolites: Toxicological investigation by *in vitro* micronucleus test and mechanisms adjacent to cell death”**

Normas:<https://www.elsevier.com/journals/food-and-chemical-toxicology/0278-6915/guide-for-authors>.

**Copaiba oil-resin generates cytotoxic and genotoxic hepatic metabolites:
Toxicological investigation by *in vitro* micronucleus test and mechanisms adjacent to cell
death**

NASCIMENTO, N. S. O.¹; RAMOS, J. P.¹; AMORIM, M. E. S. L.¹; AMARAL, B. M.¹,
FREITAS, Z. M. F.²; SANTOS, E. P.²; TAGLIATI, C.A.¹.

¹Toxicology in vitro Laboratory (ToxLab), Department of Clinical and Toxicological Analysis, School of Pharmacy-Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil.

²Department of Drugs and Medicines, School of Pharmacy-Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil.

Abstract

Copaiba oil (*Copaifera multijuga*) and its herbal products are used worldwide, however knowledge about its safety is still limited, mainly in relation to genetic toxicity. Genotoxicity assays are those used to identify substances that have the ability to interact with deoxyribonucleic acid and generate changes in hereditary characteristics. These alterations may be related to the development and/or predisposition of diseases, increased mortality, hereditary mortality and reproductive problems. The purpose of this study was to evaluate the toxicological profile of copaiba oil and its possible hepatic metabolites of a herbal formulation based on resin oil in accordance with the international guidelines of the Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) 487 “Test Micronucleus in Cells of Mammals *in vitro*” in murine V79-4 (with and without metabolic activation (S9 mix)) and human strains, HepG2. In addition, experiments were performed with propidium iodide (PI) in V79-4 cells with and without S9 to determine how the interaction of *Copaifera multijuga* with hepatic metabolism affected the mechanism of cell death and the DNA content of bacterial cells. Our results indicate that *Copaifera multijuga* oil generates cytotoxic and genotoxic hepatic metabolites in vitro. In addition, hepatic metabolism added a new toxicity profile to Copaiba and suggests a new mechanism of cell death by DNA fragmentation, which explains the greater toxicity observed in studies treated with S9 mix in relation to cells without hepatic biotransformation capacity. We also observed that *Copaifera multijuga* with S9 alters the (S) phase, the most critical stage of the cell cycle, related to a higher risk of adverse events and genetic toxicity. This comprehensive approach provides essential information for the safety of the population in the use of *Copaifera ssp*

Keywords: Copaiba oil, cytotoxicity, genotoxicity, in vitro micronucleus test, hepatic metabolism, V79-4 and HepG2 strain.

Abbreviations

BR	Control formulation (excipients only)
CPA	Cyclophosphamide
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxide
DNA	Deoxyribonucleic acid
EMS	Ethyl methanesulfonate
FBS	Bovine fetal serum
GC-MS	Gas chromatography–mass spectrometry
H	Hours
HEPG2	Cell line hepatocyte carcinoma
HGEL	Resin oil-based polymeric hydrogel
HFS	Hypotonic Fluorochromic Solution
INPA	National Institute of Amazonian Research
IR	Retention rates
IS	Survival index
MN	Micronucleus
OECD	Organization for Economic Cooperation and Development
OIL	Copaiba oil
RICC	Relative increase in cell counts
RPD	Relative Population Doubling
S9	Rat Liver Homogenate
TMSD	Trimethylsilyldiazomethane
UFAM	Federal University of Amazonas
UFMG	Federal University of Minas Gerais
UFRJ	Federal University of Rio de Janeiro
V79-4	Chinese hamster lung fibroblast cells

1. Introduction

Despite being widely reported in the literature regarding intrinsic and extrinsic toxicity related to plant-based products, irrational and indiscriminate use by the population is common, which defends the idea of harmlessness of plants for health [1]. The low reported incidence of toxicity of products of natural origin comes from the belief that these drugs are harmless by consumers [2].

There is a range of studies that correlate the medicinal plant Copaiba (genus *Copaifera* *ssp.*) with pharmacological activities, mainly correlating with treatment for inflammation and pain [5][6], healing activity [6][7] and antigenotoxic potential [9]. However, there are several other studies that have proven toxic effects of copaiba, including genotoxic activity *in vitro* [10][11][12][13][14] and *in vivo* [15].

In Brazil, due to its vast biodiversity, there is an accentuated profile of the application of these products [3]. Among the herbal medicines traditionally used in Brazilian soil, copaiba oil stands out, popularly used orally and topically, mainly for its anti-inflammatory and healing effect, to which the presence of phytochemicals is attributed: copalic acid and the β -caryophyllene and α -copaene sesquiterpenes [4].

Thus, studies that analyze the potential of genetic toxicity of these pharmaceutical products become important. Our objective is to evaluate the toxicological profile of copaiba oil-resin (*Copaifera multijuga*) and its possible hepatic metabolites, in its usual concentration (10%) and a phytotherapeutic formulation based on the oil resin in accordance with the international guidelines of the Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) 487 “*In vitro* Mammalian Cell Micronucleus Test” and also by flow cytometry.

2. Material and methods

2.1. Samples

Three samples were evaluated in this study: copaiba oil-resin, oil-based herbal formulation and control formulation (excipients only). According to the solubility study carried out previously by our research group, the samples were solubilized in 3 mL of dimethylsulfoxide (DMSO) and homogenized in ultrasound for 40 min, without heating. The dilution for treating the plates followed international guidelines, 1% DMSO solvent and 10% aqueous solvent PBS solution (phosphate-buffered saline). These solvent concentrations were standardized in all dilutions.

2.1.1. Resin oil

The resin oil, used for the production of the polymeric hydrogel, evaluated in this study belongs to the species *Copaifera multijuga*, family Fabaceae, being widely distributed in the Amazon region. This tree, ranging from medium to large in size, has compound, alternate and pinnate leaves with oval to lanceolate leaflets. Its flowers are small and white, arranged in terminal inflorescences. The fruit is a dehiscent vegetable that contains winged seeds. The bark of this species is thick, rough and gray in color. The essential oil extracted from *Copaifera multijuga* resin is widely used in the pharmaceutical and cosmetic industries due to its medicinal and therapeutic properties[50][51][52].

The botanical identification of the resin oil sample was carried out by the Seed Laboratory - INPA (botanical identification report attached) following instructions from Fidalgo & Bononi (1984)[16]. The botanical classification of the family followed the standards of APG VI (2016)[17] and the classification of the subfamily followed the LPWG (2017)[18]. The identification of the species was scientifically based on the works of Dwyer (1951) [19], Martins-da-Silva et al (2008)[20] and Costa (2007) [21].

2.1.2. Herbal formulation

The formulation of interest was developed at the Federal University of Rio de Janeiro (UFRJ). Three samples of hydrogel (Hgel) were received for the study, namely: formulation blank (Br), excipients only and polymeric hydrogel 10% copaiba oil-resin. The isolated oil (Oil) with a purity of 96.44% was also received for carrying out the experiments.

The samples were stored at room temperature (25 to 30 °C) and protected from sunlight and light, in accordance with the stability study reported by the UFRJ team. The formulation is a classic hydrogel and the main polymer used is carboxypolyethylene.

2.2. Cell culture

Murine and human cells were used. V79-4, Chinese hamster lung fibroblast, obtained from the National Institute of Metrology, Quality and Technology (INMETRO, Brasília, BR) and HepG2, human hepatoma kindly donated by the Phytochemistry Laboratory of the Faculty of Pharmacy of the Federal University of Minas Gerais. Both strains were cultured in high glucose or 4,5g/L glucose DMEM culture medium containing 1 mM sodium pyruvate (Gibco, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and 1% antibiotic solution (100 IU mL⁻¹ of penicillin and 100 µg mL⁻¹ of streptomycin) maintained in an oven at 37 °C, containing 5% CO₂ and 95% atmospheric air. After thawing, the cells were cultured and used in the experiments only up to the fifteenth passage.

2.3. Cytotoxicity and/or cytostasis assay

Cell lines were seeded in flat-bottomed 6-well plates (Kasvi, Curitiba, Brazil), 9.6 x 10⁴ cells per well, and their cell viability was measured by Trypan Blue, following OECD 487 guidelines. V79-4 and HepG2 cells were cultured for 24 hours (h) at 37 °C in an atmosphere of 5% CO₂/ 95% air. After incubation, cells were exposed, in duplicate, to Oil (33.0, 16.5, 8.25, 4.13, 2.06, 1.03, 0.52, 0.26 µg/mL), Hgel (33.0, 16.5, 8.25, 4.13, 2.06, 1.03, 0.52, 0.26 µg/mL) and Br (33.0, 16.5, 8.25, 4.13, 2.06, 1.03, 0.52, 0.26 µg/mL) for 24 h.

After this time, the wells were trypsinized for 5 minutes, inactivated with 1.5 mL of supplemented culture medium and transferred to falcon tubes. Aliquots of all concentrations (1:2 final Trypan Blue dye dilution) were taken and accounted for by the CytoSMART® Lux system - a camera-based cell viability imaging device. Unstimulated V79-4 and HepG2 cells were cultured as a control, plate 0, being counted by manual counting in the Neubauer Chamber on the second day of the experiment. Due to the limitation of hepatic metabolism of the fibroblast cell line, the test for the V79-4 cell was performed in the absence and presence of exogenous metabolic activation [24].

All tests were performed in duplicate, with appropriate negative controls 1% DMSO and positive controls (ethyl methanesulfonate and cyclophosphamide). Data represent mean ± standard deviation of duplicate determinations. The fraction of surviving cells in the treated groups was calculated considering the initial value for performing the calculations to the count obtained from plaque proliferation 0, except for the survival index which considers the value obtained from negative controls, and based on three parameters: Relative increase in cell counts (RICC), relative population doubling (RPD) indicated in OECD 487 and, for comparison, the survival index parameter (IS%), indicated in ISO 21427-2 2006(E). Due to the greater sensitivity, the RICC parameter was standardized to determine the concentrations of the genotoxicity test [24].

2.4. Micronucleus assay in mammalian cells in vitro

The micronucleus assay (MN) was used to detect possible chromosomal damage generated by contact with a genotoxic substance. The methodology is based on the microscopic detection of aneugenic (whole chromosome) or clastogenic (chromosome fragment) events that failed to integrate into the daughter cell nucleus after cell division [22][24]. The MN test was performed with (+S9) and without (-S9) metabolic activation for the V79-4 strain and -S9 for the HepG2 culture.

Cell viability results obtained by the cytotoxicity and/or cytostasis assay were used to ensure the viability of the MN assay [23]. For genotoxicity testing, it is recommended that three concentrations of each sample be tested. The selection of the highest concentration tested was that determined for poorly soluble and non-cytotoxic substances, the highest concentration that generates the smallest amount of precipitates followed by two lower concentrations that do not generate precipitate and for cytotoxic samples the highest concentration was that greater than $55 \pm 5\%$ viability using recommended cytotoxicity parameters, and the following should not be cytotoxic.[23][24]

1. Relative increase in cell counts (RICC)

$$\text{RICC} = \frac{(\text{Increase in number of cells in treated cultures (final - starting)})}{(\text{Increase in number of cells in control cultures (final - starting)})} \times 100\%$$

2. Relative Population Doubling (RPD)

$$\text{RPD} = \frac{(\text{No. of Population doublings in treated cultures})}{(\text{No. of Population doublings in control cultures})} \times 100\%$$

where: Population Doubling = $[\log (\text{Post-treatment cell number} \div \text{Initial cell number})] \div \log 2$

3. Survival index ISO 21427-2 2006(E)

$$\text{IS} = \frac{\text{Number of viable cells in the test sample}}{\text{Number of viable cells in the negative control}} \times 100\%$$

2.4.1. MN assay without metabolic activation

V79-4 cells were seeded at 3×10^4 cells per well in 6-well plates at 37°C with 5% CO_2 for 6 h. Cells were then exposed to Oil (16.5, 8.25, 4.13 $\mu\text{g/ml}$ and cytotoxic concentration 23.1 $\mu\text{g/ml}$), Hgel (1.03, 0.52 and 0.26 $\mu\text{g/ml}$) and Br (1.03 $\mu\text{g/ml}$). After 24h, cells were collected and hypotonic treatment was performed with 1,5% sodium citrate solution for 3 min. The positive control was ethyl methane sulfonate (EMS) (Sigma-Aldrich, USA), 350 $\mu\text{g/ml}$. The sample vehicle, DMSO (dimethylsulfoxide), was used as a negative control [24].

For cell fixation, formaldehyde, ethanol, acetic acid (1:60:20 v/v) were added for 5 min. The fixation process was performed twice. The slides were allowed to dry at room temperature for 24 hours and stained with May Grunwald stain for 3 min and Giemsa stain for 20 min. For each treatment, 2000 cells with 0, 1, 2, 3 or more MNs were counted. Proliferation index (PI) and mitotic index (MI) were calculated to estimate cell proliferation and the relative number of cell cycles per cell in the treated groups[24].

2.4.2 MN assay with metabolic activation

The protocol used was similar with and without metabolic activation, except that the murine S9 mix was used in this phase. The concentrations used were Oil (2.06, 1.03, 0.52 $\mu\text{g/mL}$ and cytotoxic concentration 4.13 $\mu\text{g/mL}$), Hgel (1.03, 0.52 and 0.26 $\mu\text{g/mL}$) and Br (1.03 $\mu\text{g/mL}$). To each well was added 500 μL (%) of the S9 mix. Mixture S9 was prepared as follows: Phosphate buffer (15×10^{-3} mol L^{-1}); NADP^+ (4×10^{-3} mol L^{-1}); glucose

6-phosphate (5×10^{-3} mol L⁻¹); KCl (33×10^{-3} mol L⁻¹); MgCl₂ (8×10^{-3} mol L⁻¹); S9 (S2067, Rat Liver Enzyme Mixture, Sigma-Aldrich, San Luis, USA), 1 part of the S9 fraction to 9 parts of the S9 cofactor solution. Cells were incubated at 37 °C for 4 h with DMEM without FBS; then, the medium was removed and replaced with supplemented medium. After 20 h, the steps were performed as in the experiments with S9. DMSO diluted in PBS, a sample vehicle, was used as a negative control. The positive control was cyclophosphamide, 32 µg/ml [24].

2.4.3 MN-HepG2 Assay

The protocol in accordance with the test carried out with the V79-4 strain without exogenous activation was followed, the concentrations used were Oil (8.25, 2.06, 1.03 µg/mL, cytotoxic concentration 8.25 µg/mL), Hgel (1.03, 0.52 and 0.26 µg/mL) and Br (1.03 µg/mL) [24].

2.5. Cell cycle/DNA fragmentation

Determination of cell death mechanism and quantification of DNA content. Quantification of DNA content and cell cycle analysis was performed in flow cytometry, the FACSCanto™ II cytometer, according to the method described by Nicoletti et al. (1991) [25]. The V79-4 cell was standardized for this experiment, due to the low frequency of mutation and alterations in the genetic material. For the evaluation of the influence of hepatic metabolites, we used exogenous metabolism of 20% of S9. Oil (33, 16.5 and 4.13 µg/mL) and Hgel (33, 16.5 and 4.13 µg/mL) concentrations were selected for both tests. They were grown, 1×10^6 cells per well in 6-well plates, and incubated for 24 to 37 °C.

After stabilization, all cells were incubated with the substances for 24 h without metabolic activation. After the treatment period, the cells were transferred to Falcon tubes and centrifuged at 10,000 rpm for 5 min. The supernatant was discarded and 300 µL of a Hypotonic Fluorochromic Solution (HFS) were added to the tubes containing the cell precipitate, containing 50g/ml of Propidium Iodide - PI (Sigma, Saint Louis, Missouri USA) and 0.1% of triton X-100 (Sigma, Saint Louis, Missouri USA) in 0.1% sodium citrate (Sigma, Saint Louis, Missouri USA). The plates were incubated for 4 to 8°C.

After incubation, the samples were submitted to analysis by flow cytometry. Acquisitions were performed according to Kang K et al. (2010) [49]. The FL2 voltage was adjusted so that the G0/G1 and G2/M phases formed peaks of values, respectively, of 200 and 400 in FL2-A. The FSC-H, SSC-H, FL2-A and FL2-W values were acquired for histogram and statistical analysis in the FlowJo 10.8 ® program (Tree Star, Inc).

In the S9 assay, cells were incubated at 37 °C for 4 h with culture medium without FBS; then, the medium was removed and replaced with FBS-supplemented medium. After 20 hours, the steps were performed as in tests without activation.

2.6. Statistical analysis

Statistical analysis was performed with GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, USA). All quantitative data for the MN test were normalized to 2000 cells. Data were analyzed by Pearson's chi-square (χ^2) test analysis. Flow cytometry data were evaluated by analysis of variance (ANOVA) and subsequently by Dunnett's test. $P < 0.05$ was considered significant.

3. Results

3.1. Profile of the samples

Copaiba oil showed exacerbated toxicity in the cell lines tested, and it was not possible to evaluate its activity at 100% concentration. Therefore, the analysis was standardized based on the maximum possible limit and the equivalent concentration in the herbal formulation, initial dilution of 10% of the oil. Cytotoxicity tests were performed to determine the maximum concentration to be tested in cytogenetic assays, given that, for reliable results, cytotoxicity should not exceed a reduction of about 50% in cell proliferation [23].

The polymeric hydrogel presented toxicity and solubility as limitations (Figure 1). Studies were carried out in parallel with the formulation control (blank) demonstrating that the presence of precipitate came from the excipients and not from the drug. As expected, the toxicity of the formulation followed the same dose-response profile presented by copaiba oil-resin.

Solubility is an extremely important factor. OECD guideline 487 determines that the highest concentration to be tested in the in vitro micronucleus test is the lowest precipitation concentration, even when toxicity occurs above the solubility limit in tissue culture medium [23][24][43]. Examination of precipitation can be done with the naked eye or microscopically [43]. The precipitation was examined under the optical microscope at the end of the treatment, with the intention of identifying the precipitate present during the treatment.

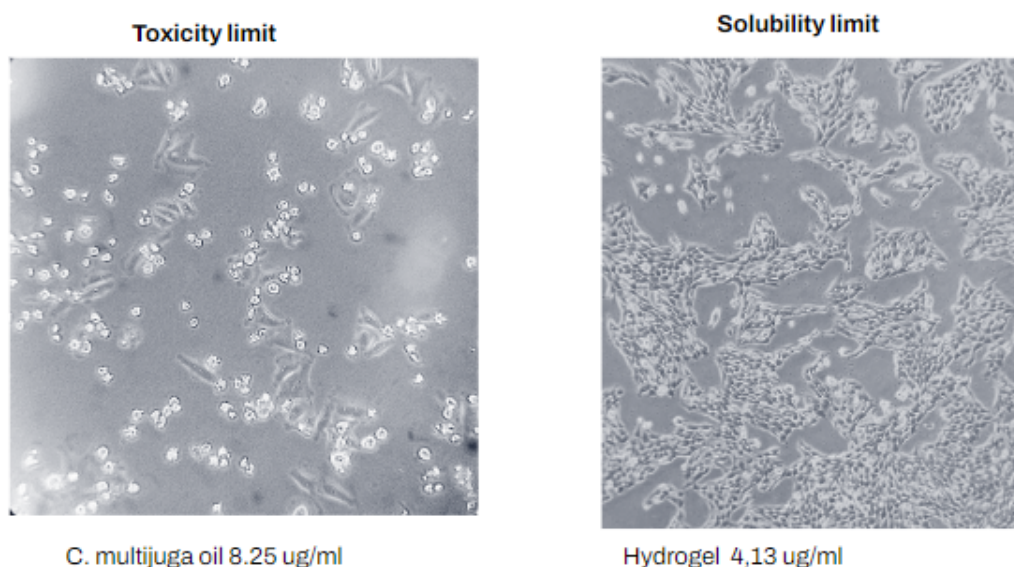


Figure 1. Profile of the samples. The copaiba oil-resin (*C. multijuga* oil) showed limitation of toxicity and the polymeric hydrogel of solubility, that is, it presented a precipitate

3.2. Copaiba oil-resin (*Copaifera multijuga*) has cytotoxic metabolites in vitro.

The evaluation showed that the cytotoxicity profile of copaiba oil was different in strains with metabolic competence (exogenous or endogenous) and those without metabolization capacity (Figure 2). In addition, it was shown in this study that the herbal formulation has the same cytotoxicity profile, that is, the excipients did not influence the characteristics of *copaiba* oil-resin, they were inert in the strains tested (Figure 2c).

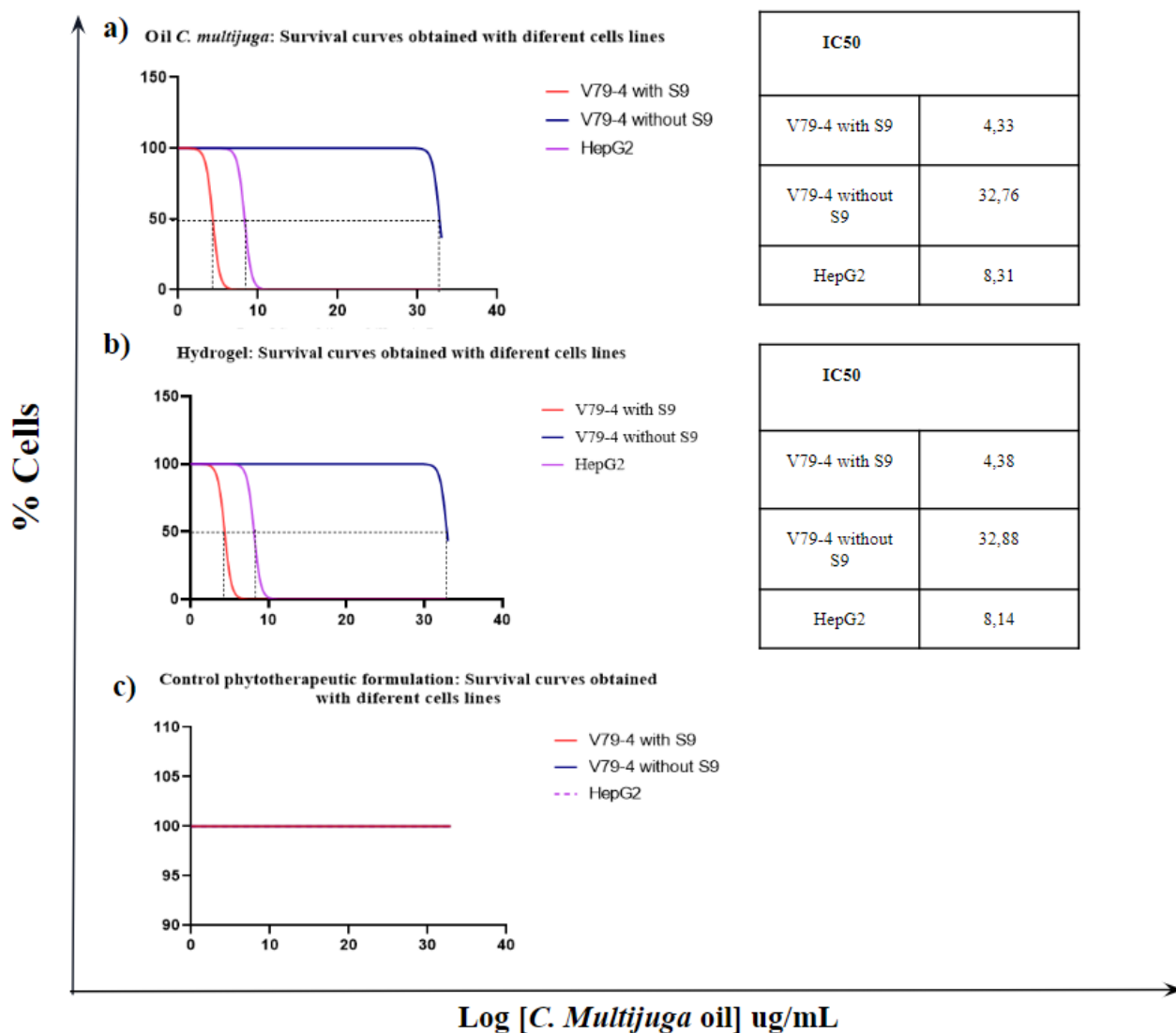


Figure 2. Toxicity profile in different cell lines. Survival curve of V79-4 cells without S9, with S9 and HepG2 cell treated with: A. Copaiba oil-resin (*C. multijuga* oil), B. Oil-based polymeric hydrogel and C. Control herbal formulation (excipients only).

3.3. *Copaiba* showed a genotoxic profile in a human cell competent for hepatic metabolism (HepG2) at concentrations 8.25 ug/mL and 2.06 ug/mL.

In the in vitro micronucleus test with a human cell competent for hepatic metabolism (HepG2), copaiba oil-resin showed genotoxicity in two of the three concentrations tested, 8.25 ug/mL and 2.06 ug/mL (Figure 3a). Hgel did not show an increase in the frequency of micronuclei at the tested concentrations (1.03 ug/mL, 0.52 ug/mL and 0.26 ug/mL) and Br also did not demonstrate genotoxicity at 1.03 ug/mL (Figure 3b).

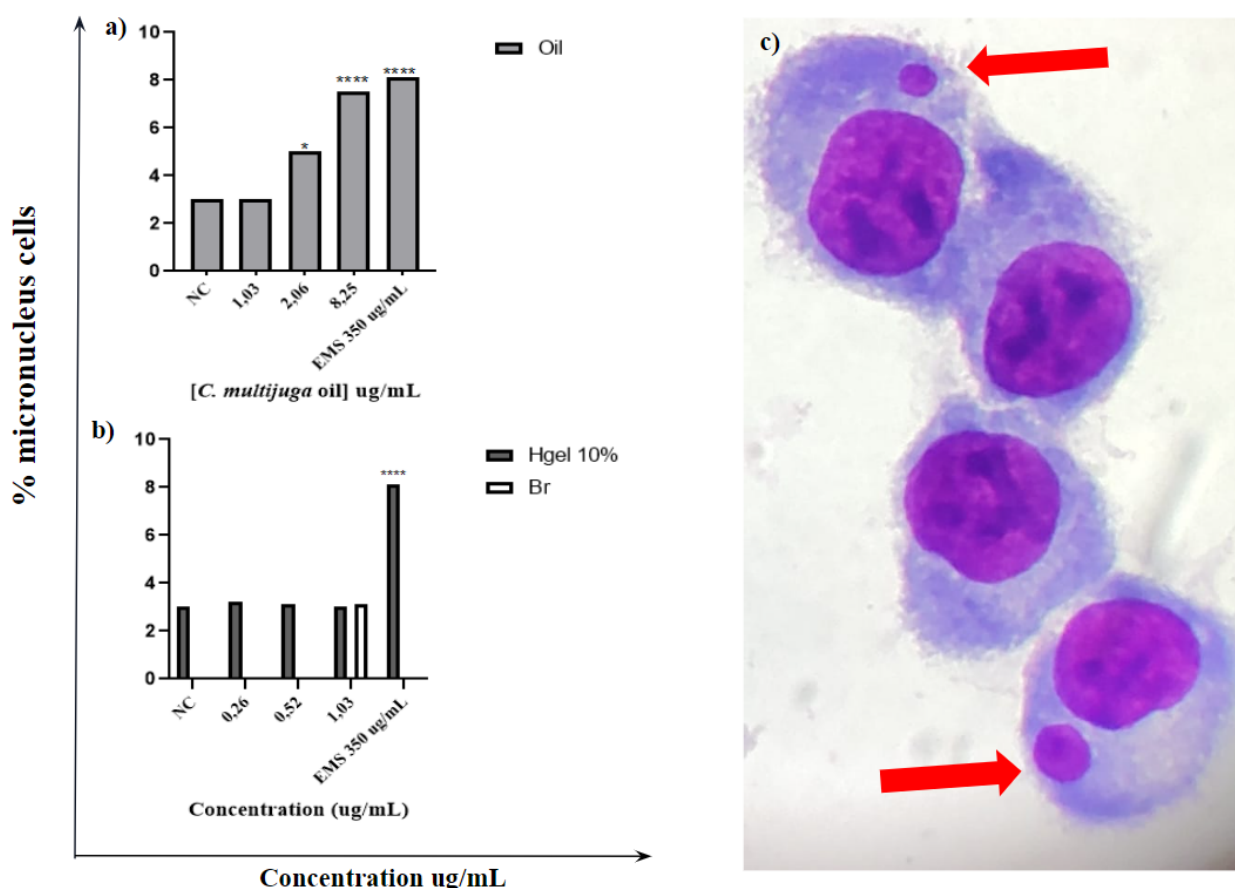


Figure 3. Frequency of micronucleated cells/2000 cells - HepG2. A. Cells treated with copaiba oil-resin (*C. multijuga* oil) at concentrations 8.25 ug/mL, 2.06 ug/mL and 1.03 ug/mL, B. Polymeric hydrogel (Hgel 10%) 1.03 ug/mL, 0.52 ug/mL and 0.26 ug/mL and Control herbal formulation (Br) 1.03 ug/mL. C. Micronucleated cells. Micronuclei indicated by red arrows

3.4. In murine cells with exogenous metabolic activation (V79-4) the sample presented a dose-dependent profile for the evaluation of genotoxicity.

Figure 4 shows the micronucleus (MN) values found in the V79-4 strain with and without metabolic activation treated with copaiba oil-resin, Hgel and Br. There was no statistical difference between the tested concentrations for the frequency of MN in relation to the negative control ($P > 0.05$).

A dose-response trend was observed in V79-4 cells with S9, ie, the frequency of micronuclei decreased with decreasing concentration of the substance. In addition, at the highest concentration tested in rat lung fibroblast, copaiba oil-resin reached the maximum allowable micronucleus (MN) limit for test negativity in relation to the historical negative control values of the tested laboratory.

Added to this, cells with a profile of positive samples for genotoxicity were observed, that is, multi-micronucleated cells and MN with large diameters (approximately 30% of the nucleus). The technique is not specific for the detection of cell death, however, an exacerbated presence of cells with broken chromosomes, possible apoptotic bodies and swollen was noted during the counting of slides with metabolic activation (Figure 4e).

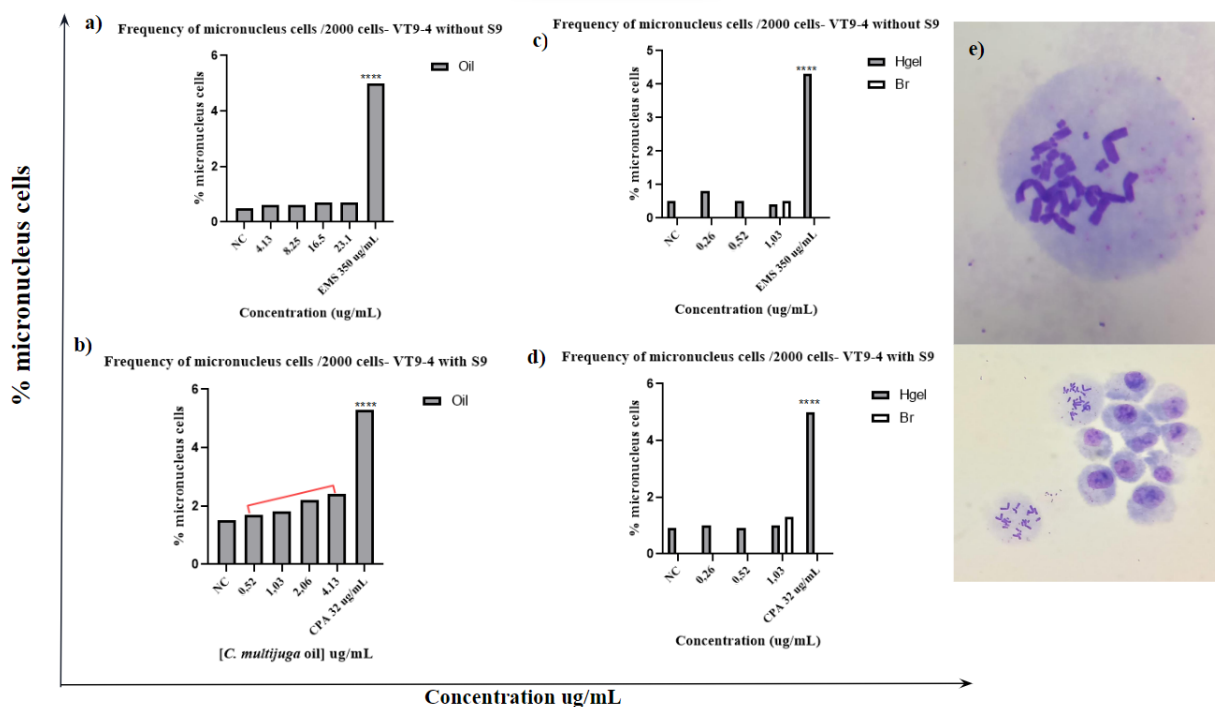


Figure 4. Frequency of micronucleated cells/2000 cells - V79-4 with and without S9. Cells without metabolic activation treated with: A. Copaiba oil-resin (*C. multijuga* oil) at concentrations of 23.4 ug/mL, 16.05 ug/mL, 8.25 ug/mL and 4.13 ug/mL ; C. Polymeric hydrogel (10% Hgel) 1.03 ug/mL, 0.52 ug/mL and 0.26 ug/mL and control herbal formulation (Br) 1.03 ug/mL (without S9). Cells with metabolic activation treated with B. copaiba oil-resin (oil from *C. multijuga*) at concentrations of 4.13 ug/mL, 2.06 ug/mL, 1.03 ug/mL and 0.52 ug/mL, D. Polymeric hydrogel (10% Hgel) 1.03 ug/ml, 0.52 ug/ml and 0.26 ug/ml and control herbal formulation (Br) 1.03 ug/ml (with S9). E. Cells swollen with broken chromosomes.

3.5 A genotoxic event, DNA fragmentation was observed in copaiba oil-resin with S9 and in the herbal formulation. However, DNA fragmentation was not observed in *C. multijuga* without S9; That is, it did not show genotoxicity and/or apoptosis without metabolic activation.

Through the flow cytometry technique with propidium iodide (PI) labeling, no DNA fragmentation was observed in copaiba oil-resin without metabolic activation at the tested concentrations (33 ug/mL and 16.5 ug/mL), figure 6 a, b and c. However, in the presence of the S9 mix, DNA fragmentation was observed at concentrations of 33 ug/mL and 4.13 ug/mL (10% and 1.25% of copaiba oil-resin respectively) (Figure 5 and Figure 6 d, e and f). The experiments carried out with the phytotherapeutic formulation showed the same profile as those carried out with the copaiba oil-resin (Figures 7).

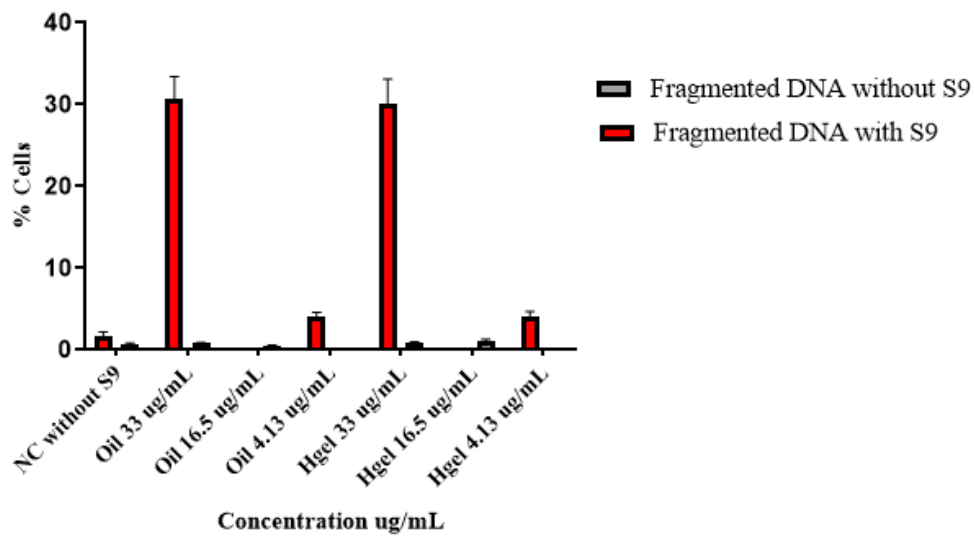


Figure 5 . Genotoxicity in V79-4 cells with S9 treated with copaiba oil-resin (*C. multijuga* oil) and resin oil-based polymeric hydrogel.

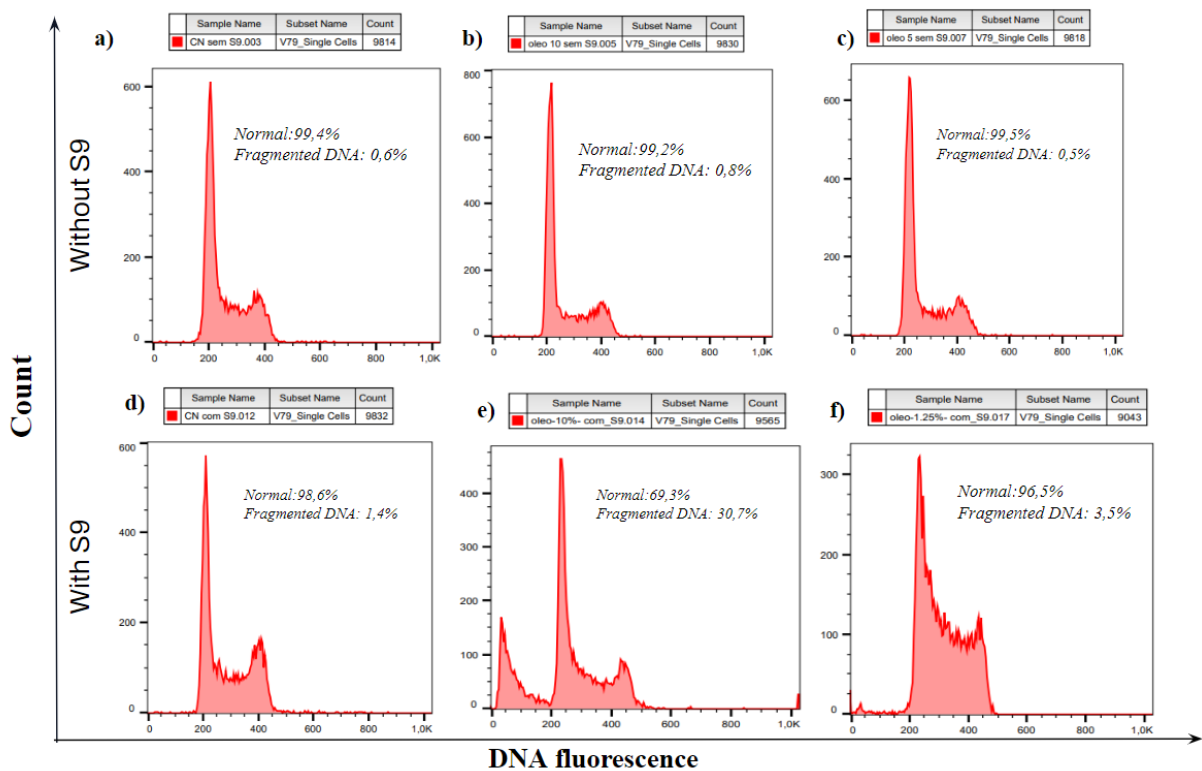


Figure 6 . Fluorescence histograms of DNA from cells treated with copaiba oil-resin (*Copaifera multijuga* oil). Cells without metabolic activation treated with: A. Vehicle DMSO, negative control; B. Copaiba oil-resin at a concentration of 33 ug/mL; C. Copaiba oil-resin at a concentration of 16.5 ug/mL. Cells with metabolic activation treated with: D. Vehicle DMSO, negative control; E. Copaiba oil-resin at a concentration of 33 ug/mL; F. Copaiba oil-resin at a concentration of 4.13 ug/mL.

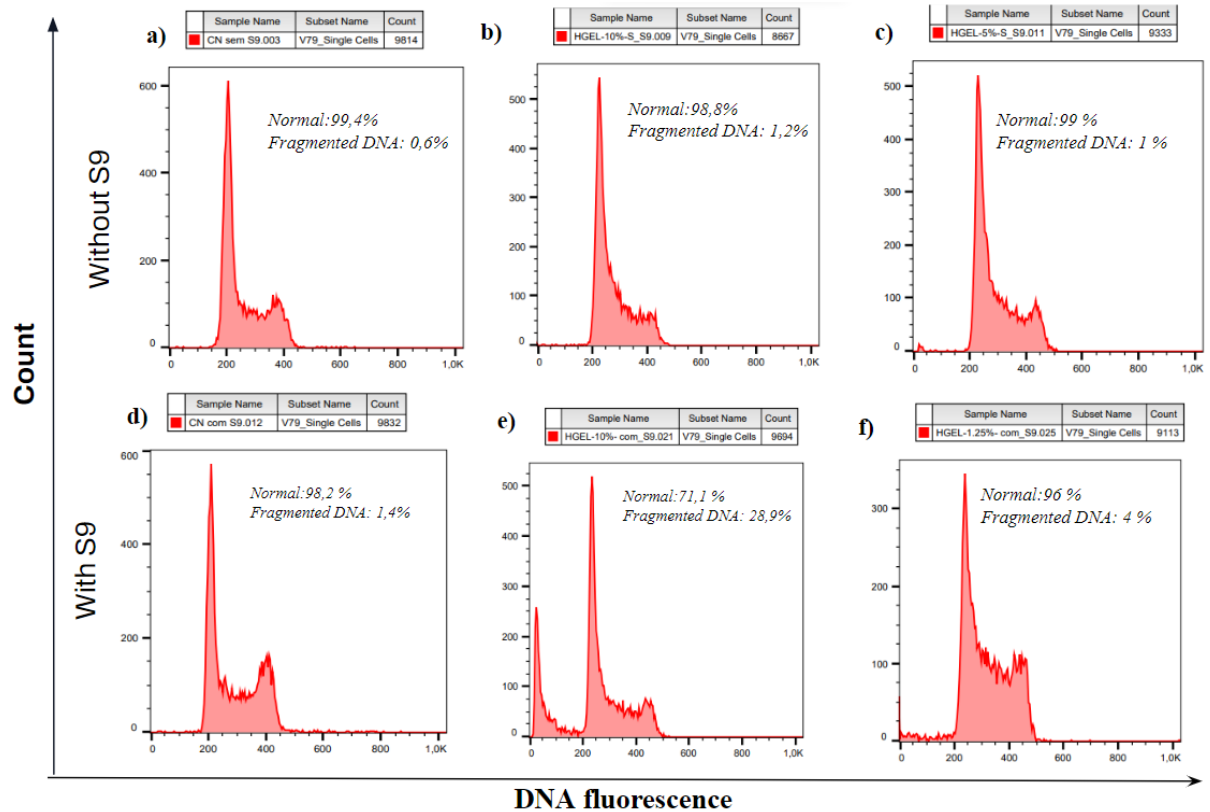


Figure 7. Fluorescence histograms of DNA from cells treated with Hydrogel based on copaiba oil-resin (*Copaifera multijuga* oil). Cells without metabolic activation treated with: A. Vehicle DMSO, negative control; B. Polymeric hydrogel in the concentration of 33 ug/mL of copaiba oil-resin; C. Polymeric hydrogel at a concentration of 16.5 ug/mL of copaiba oil-resin. Cells with metabolic activation treated with: D. Vehicle DMSO, negative control; E. Polymeric hydrogel in the concentration of 33 ug/mL of copaiba oil-resin; F. Polymeric hydrogel at a concentration of 4.13 ug/mL of copaiba oil-resin.

3.6. Copaiba oil-resin altered the cell cycle of V79-4 strains with metabolic activation at the highest tested concentration, reducing concentrations of cells in S phase.

Figures 8 and 9 depict the cell cycle of V79-4 with S9 and V79-4 without S9 strains treated with copaiba oil-resin and Hgel. There was no statistical difference between the tested concentrations and the negative control for cell cycle without metabolic activation ($P > 0.05$).

On the other hand, in the samples tested in the presence of S9, statistical significance was observed for the synthesis phase (S) at the highest concentrations, Oil 33 ug/mL ($P = 0.0129$) and Br 33 ug/mL ($P = 0.0269$), the substances reduced the percentage of cells present in this phase (Figure 9e). In the other cellular processes, no statistically significant influence was observed ($P > 0.05$) (Figure 9d and f).

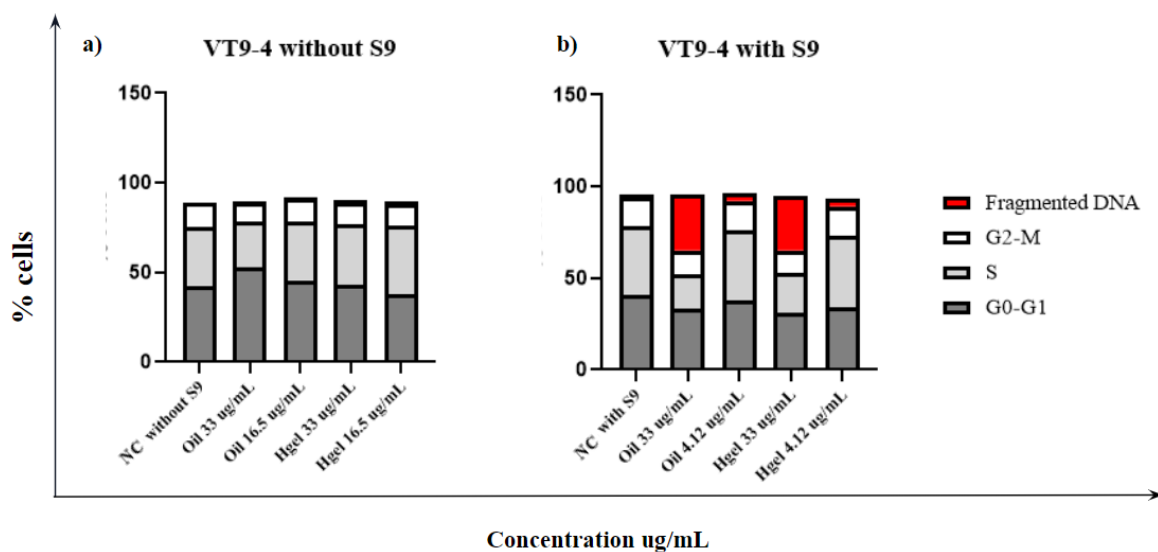


Figure 8. Analysis of the cell cycle of the V79-4 strain treated with copaiba oil-resin (*Copaifera multijuga* oil) and hydrogel based on resin oil. A. Cells without metabolic activation B. Cells with metabolic activation

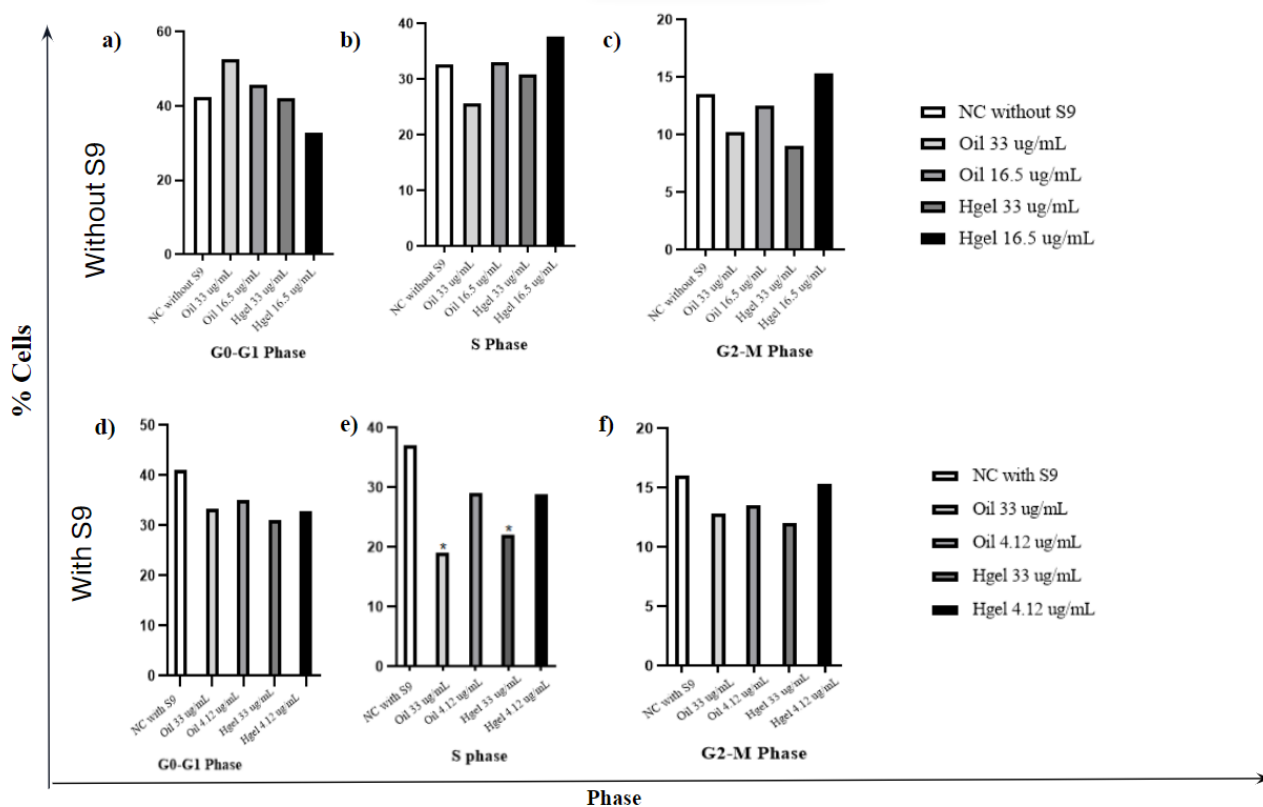


Figure 9. Cell cycle of V79-4 +S9 and V79-4 -S9 strains treated with copaiba oil-resin (*C. multijuga* oil) and Hgel. Cells without metabolic activation: A. G0-G1 phase; B. Phase S; C. Phase G2-M. Cells with metabolic activation: D. G0-G1 phase; E. Phase S; F. Phase G2-M.

4. Discussion

In this study, it was demonstrated that copaiba oil-resin is biotransformed by liver enzymes, and these metabolites showed an accentuated cytotoxicity profile in relation to the strain without metabolization capacity (V79-4 without S9). There are data in the literature describing the hepatic metabolism of Copaiba, but there were no data on safety [26]. Our results demonstrate that these cytotoxic metabolites are biotransformed by common pathways in the murine hepatic system and human hepatoma, with a marked influence on the harmful profile of the tested cells.

A major discussion regarding the safety of herbal products is the failure to carry out preliminary cytotoxicity studies before carrying out the genotoxicity and/or mutagenicity evaluation tests, in addition to the absence of studies that carried out the tests following international guidelines. For example, Copaiba safety studies such as those carried out by Alves et al. (2018) and Furtado et. al. (2018) who were negative in vitro for the genotoxic event did not mimic the action of CYP450 enzymes using S9 metabolic activation, nor was a competent cell line used for metabolization[9][27].

To illustrate this scenario, we mention Kava-kava (*Piper methysticum*), a medicinal plant widely used in the treatment of anxiety, which is an example of harmful metabolites for health. It is described that the alkaloid pipermethystine can induce the death of liver cells when metabolized, glutathione (GSH) depletion and modulate the MAPK and NF- κ B signaling pathways in vitro [28].

In the *in vitro* micronucleus test with a human cell competent for hepatic metabolism (HepG2), *Copaifera multijuga* resin oil showed genotoxicity in two of the three concentrations tested, 8.25 μ g/mL and 2.06 μ g/mL, demonstrating that these metabolites have the ability to interact with the DNA of organisms and cause damage. It can be stated that the observed genotoxicity comes from the products of metabolism, given that, in murine cells unable to metabolize substances by CYP450 (V79-4 without activation), there was no statistical difference in the frequency of MN in treated and untreated cells. Regarding the murine cells treated with S9 mix, no statistical difference was noted between the samples, however, a dose-response trend was observed in relation to the treatment, suggesting that at higher concentrations it would be possible to observe an increase in the frequency of micronuclei.

One hypothesis for the genotoxicity by biotransformation in the *in vitro* micronucleus technique to be observed in HepG2 and not in V79-4 with exogenous activation is the time of exposure of the substance. This occurs due to the difference in the exposure time of the protocol for competent human cells, since the exposure time for copaiba oil-resin includes 24 hours of treatment, in the exogenous system, due to the toxicity of the S9 mix, while the OECD recommends 4 hours[29][24]. Another possible scenario would be to question the predictability of the induced rat liver S9 fraction for the formation of micronucleus-inducing metabolites after a genotoxic event, given that rat and human CYP concentrations may differ in their substrate selectivities and catalyzed reactions [29].

With regard to the hepatic metabolites of Copaiba, it is necessary to carry out future studies to describe which is the main metabolite that causes the observed genotoxicity and cytotoxicity. If the predominant metabolization product comes from beta-caryophyllene, this genotoxic and cytotoxic characteristic is linked to the species *multijuga* Hayne and cannot be extrapolated to the entire genus *Copaifera* ssp. However, if copalic acid, which is a biomarker for species of the genus *Copaifera*, is causing toxic metabolites, it can be said that all species have this profile [31][32].

In addition, it is important to uncover the biotransformation mechanism observed in oil resin from *C. multijuga*. A pertinent discussion is whether the generation of harmful metabolites from Copaiba would occur *in vivo*, similar to what occurs in the metabolization of paracetamol. Therefore, if this substance has the same profile, this product should be used with caution, as liver products may have an impact on the health of consumers.

According to Darroudi and authors (2010) [42] human hepatoma cells (HepG2) reflect the activation/detoxification of genotoxic compounds better than other currently used indicator cells and therefore have an increased predictive value for the identification of mutagenic and genotoxic constituents. However, the S9 mix also has an excellent predictability of activation and inactivation of compounds, since it contains isoforms of cytochrome P450 (phase I metabolism) and in its cytosolic portion it contains most of the activities of transferases (phase II metabolism) [29][30]. The experimental models used are predictors for activated and subsequently inactivated metabolites *in vivo*, therefore it is extremely important that the biotransformation of copaiba oil-resin is evaluated in order to guarantee the safety of consumers [29][30][34].

However, another point to be evaluated is the pharmaceutical form of the medicine based on medicinal plants. The concentration of phytochemicals in the oil is different from those obtained in tea and/or medicinal plant extract [35]. Therefore, results that demonstrated genetic safety as described by Pavan et al. (2018) [36], who studied the genotoxic activity of copaiba tea, and Damasceno and authors (2019) [37], who evaluated the toxicity of *Copaifera* extracts, should not be extrapolated to other herbal presentations of the same plant drug, especially if it is in a different species of the same genus.

Our results obtained by flow cytometry corroborate the genotoxic and cytotoxic characteristics of Copaiba metabolites. In this study, it was seen that hepatic metabolization added a new toxicity profile to Copaiba, generating DNA fragmentation, genotoxicity, and adding a new mechanism of cell death by DNA fragmentation, as it explains the greater toxicity observed in samples treated with S9.

Based on the described concept of genotoxicity, the ability of a substance to cause damage to the genetic material of organisms, it is possible to state that this fragmentation observed in the V79-4 strain with S9 is a genotoxic event [38][39]. Regarding the mechanism of cell death, a change in the profile was observed between the strains treated and not treated with exogenous metabolism. By the definition of apoptosis, mechanism of programmed cell death that is characterized by the fragmentation of DNA generated by the activation of caspases [40] and, by the methodology described by Nicoletti et al. (1991) [21] for quantification of DNA content and analysis of the cell cycle, it can be stated that the cell death mechanism of copaiba oil-resin without activation is not apoptosis.

These results are relevant because some studies, such as those performed by Urasaki et al. (2020) [41] and Cavalcanti et al. (2009) [14], attest that Copaiba is responsible for inducing apoptosis, a fact that we did not observe without metabolic activation. With activation of the S9 mix, this profile of cell death by DNA fragmentation, possibly apoptosis, was noted. However, it is necessary to carry out new experiments with annexin and propidium iodide to confirm the type of death, that is, necrosis, early or late apoptosis.

Our hypothesis, for alteration of the disposition of the cytotoxicity of copaiba oil-resin without and with S9 is that, without the influence of the metabolites, the death occurs only by membrane lesion, being easily detected by the trypan blue dye [8]. However, when conducting biotransformation, the metabolites add a new type of death, by DNA fragmentation, explaining the marked toxicity with metabolic activation. Morguette and authors (2019) described the cell death of *Copaifera* due to membrane damage, however, it is

pertinent to carry out new tests with LDH (lactate dehydrogenase) to prove these different profiles [44].

Regarding the cell cycle, metabolic activation also generated significant changes. Copaiba biotransformation reduced the (S) phase at a concentration of 33 ug/mL. These results are extremely relevant, given that, in this phase, through DNA replication, the genetic information must be accurately transmitted to the daughter cells in phase division (G2-M) to guarantee the stability of the genetic characteristics, the most critical part of the cell cycle [45].

Urasaki et al. (2020) [41] indicated that *Copaifera* negatively regulates the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway, which is important in regulating the cell cycle and is directly related to cell proliferation and the occurrence of neoplasms. Our results confirm this finding of interference in the cycle, in addition to demonstrating the genetic risk that this herbal medicine exposes to users. This effect is similar to that of chemotherapy drugs, when most of these drugs act in the (S) phase of cells and the toxic, genotoxic and mutagenic effects of these drugs are widely reported in the literature [45][46][47][48].

5. Conclusion

We investigated the genetic safety of *Copaifera multijuga* resin oil and the impact of hepatic metabolism in V79-4 cells (with and without S9 mix) and HepG2. It can be concluded that there is a significant difference in the toxicity profile in cells competent for hepatic metabolism (endogenous and exogenous) and cells incapable of metabolism. Furthermore, hepatic activation of Copaiba in HepG2 cells increased the frequency of MN in treated cells. No MN addition was noted in V79-4 cells with and without the S9 mix. Flow cytometry results confirmed the genotoxicity present in the *Copaifera* biotransformation, demonstrating fragmented DNA. In addition, the present study demonstrates that there is a difference in the mechanism of cell death with and without activation, possibly membrane injury is the process that causes toxicity in cells treated with copaiba without activation. However, when biotransformation of the substance occurs, it is suggested that a new mechanism of cell death by DNA fragmentation is added, possibly apoptosis. We observed that Copaiba +S9 alters the (S) phase, the most critical stage of the cell cycle, related to a higher risk of genotoxicity and cytotoxicity. Some of the results found in the present study, toxic and genotoxic effects in vitro [10][11][12][13][14][15] and the mechanism of cell death due to membrane damage [44], are based on research carried out. However, other findings are contradictory, cell death by apoptosis without metabolic activation [14][41] and antigenotoxic potential [9]. copaiba oil-resin is a very important herbal medicine with promising potential applications, but there is still a great need for further studies to fully understand its safety in biological systems. To our knowledge, this is the first article in which the cytotoxicity and genotoxicity of the biotransformation of *Copaifera ssp.* was investigated simultaneously in two cell lines and faithfully following international guidelines. This comprehensive approach provides essential information for the safety of the population in the use of *Copaifera ssp.*

6. References

- [1] PAWLOWSKI, Â; KALTCHUK-SANTOS, E.; ZINI, C. A.; CAMARÃO, E. B.; SOARES, G.L. G. **Essential oils of *Schinus terebinthifolius* and *S. molle* (Anacardiaceae): Mitodepressive and aneugenic inducers in onion and lettuce root meristems.** South african journal of botany, v.80, p.96-103, 2012.

- [2] JORDAN, S.A, CUNNINGHAM, D. G, MARLES, R.J.(2010). **Assessment of herbal medicinal products: challenges, and opportunities to increase the knowledge base for safety assessment.** Toxicology and Applied Pharmacology, 1;243(2):198-216
- [3] LORENZI, H. & MATOS, F. J. de A. (2008). **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas.** 2. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum.
- [4] TEIXEIRA, F. B.; SILVA, R. B.; LAMEIRA, O. A.; WEBBER, L. P.; D'ALMEIDA COUTO, R. S.; MARTINS, M. D.; LIMA, R. R. **Copaiba oil-resin (*Copaifera reticulata* Ducke) modulates the inflammation in a model of injury to rats' tongues.** BMC Complement Altern Med.; 17: 313, 2017.
- [5] MARTINI, C. A. N.; SCAPINI, J. G. S.; COLLAÇO, L. M.; MATSUBARA, A.; VEIGA JUNIOR, V. F. **Análise comparativa dos efeitos do óleo-resina de *Copaifera multijuga* e da nitrofurazona na cicatrização de ferida cutânea.** Rev. Col. Bras. Cir.; 43(6): 445-451, 2016.
- [6] PAIVA, L.A; DE ALENCAR CUNHA K.M.; SANTOS F.A.; GRAMOSA N.V.; SILVEIRA, E.R., RAO, V.S. Investigation on the wound healing activity of oleo-resin from *Copaifera langsdorffii* in rats. *Phytotherapy Research* 16 (8): 737-9, 2002.
- [7] MAGUTU T. (2022). **Compounding with Pracaxi Versus Copaiba Oil.** International journal of pharmaceutical compounding, 26(4), 277–281. MARTINS-DA-SILVA, R. C. V.; PEREIRA, J. F. & LIMA, H. C. **O gênero *copaifera* (leguminosae – caesalpinioideae) na amazônia brasileira.** *Rodriguésia* 59 (3): 455-476, 2008.
- [8] J.R. Tennant **Evaluation of the trypan blue technique for determination of cell viability Transplantation**, 2 (1964), pp. 685-694, 10.1097/00007890-196411000
- [9] ALVES JM, LEANDRO LF, SENEDESE JM, CASTRO PT, PEREIRA DE, RESENDE FA, CAMPOS DL, SILVA JJM, VARANDA EA, BASTOS JK, AMBRÓSIO SR, TAVARES DC (2018) **Antigenotoxicity properties of *Copaifera multijuga* oleoresin and its chemical marker, the diterpene (-)-copalic acid.** *J Toxicol Environ Health A* 81:116–129. <https://doi.org/10.1080/15287394.2017.1420505>
- [10] ALVES JM, SENEDESE JM, LEANDRO LF, CASTRO PT, PEREIRA DE, CARNEIRO LJ, AMBRÓSIO SR, BASTOS JK, TAVARES DC. ***Copaifera multijuga* oleoresin and its constituent diterpene (-)-copalic acid: Genotoxicity and chemoprevention study.** *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen.* 2017 Jul;819:26-30. doi: 10.1016/j.mrgentox.2017.05.001. Epub 2017 May 3. PMID: 28622827.
- [11] CARDOSO P.C.D.S, ROCHA C.A.M.D, LEAL M.F, BAHIA M.O, ALC NTARA D.D.F.Á., SANTOS R.A.D, GONÇALVES N.D.S, AMBRÓSIO S.R., CAVALCANTI B.C., MOREIRA-NUNES C.A, PESSOA C.D.Ó, BURBANO R.M.R. **Effect of diterpenoid kaurenoic acid on genotoxicity and cell cycle progression in gastric cancer cell lines.** *Biomed Pharmacother.* 2017 May;89:772-780. doi: 10.1016/j.biopha.2017.02.085. Epub 2017 Mar 6. PMID: 28273639.
- [12] CAVALCANTI, B. C. **Avaliação do potencial genotóxico e mutagênico do ácido caurenóico, um diterpeno isolado da planta *Copaifera Langsdorffii* Desf. (Leguminosae).** 2006. 95 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.
- [13] CAVALCANTI, B. C., COSTA-LOTUFO, L. V., MORAES, M. O., BURBANO, R. R., SILVEIRA, E. R., CUNHA, K. M. A., ... PESSOA, C. (2006). **Genotoxicity evaluation of kaurenoic acid, a bioactive diterpenoid present in *Copaiba* oil.** *Food and Chemical Toxicology*, 44(3), 388–392. doi:10.1016/j.fct.2005.08.011.
- [14] CAVALCANTI, B. C., BEZERRA, D. P., MAGALHÃES, H. I., MORAES, M. O., LIMA, M. A., SILVEIRA, E. R., CÂMARA, C. A., RAO, V. S., PESSOA, C., & COSTA-LOTUFO, L. V. (2009). **Kauren-19-oic acid induces DNA damage followed by apoptosis in human leukemia cells.** *Journal of applied toxicology : JAT*, 29(7), 560–568. <https://doi.org/10.1002/jat.1439>

- [15] CHEN-CHEN, L. and SENA, MA., 2002. **Atividade tóxica e mutagênica do óleo de copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desfon) em camundongos.** *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, vol. 5, no. 1, p. 37-40.
- [16] FIDALGO, O. & BONONI, V.L. 1984. **Técnicas de coleta, preservação e herborização de material botânico.** Instituto de Botânica, São Paulo, 62 p.
- [17] The Angiosperm Phylogeny Group, M. W. Chase, M. J. M. Christenhusz, M. F. Fay, J. W. Byng, W. S. Judd, D. E. Soltis, D. J. Mabberley, A. N. Sennikov, P. S. Soltis, P. F. Stevens, **An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV**, *Botanical Journal of the Linnean Society*, Volume 181, Issue 1, May 2016, Pages 1–20, <https://doi.org/10.1111/boj.12385>
- [18] LPWG-The Legume Phylogeny Working Group. 2017. **A new subfamily classification of the Leguminosae based on a taxonomically comprehensive phylogeny: The Legume Phylogeny Working Group (LPWG).** *Taxon*, 66: 44–77.
- [19] DWYER, J. 1951. **The Central American, West Indian, and South American species of *Copaifera* (*Caesalpinioideae*).** *Brittonia*, 7: 143–172.
- [20] MARTINS-DA-SILVA, R.; PEREIRA, J.; LIMA, H. 2008. **O gênero *Copaifera* (Leguminosae –Caesalpinioideae) na Amazônia brasileira.** *Rodriguésia*, 59: 455–476.
MONTES, L.V.; BROSEGHINI, L.P., ANDREATTA, F.S., SANT’ANNA, M.E.S.; NEVES, V.M.; SILVA, A.G. **Evidências para o uso da óleo-resina de copaíba na cicatrização deferida – uma revisão sistemática.** *Natureza on line* 7 (2): 61- 67, 2009.
- [21] COSTA, J. 2007. **Estudos taxonômicos, biosistemáticos e filogenéticos em *Copaifera* L. (Leguminosae – Detarieae) com ênfase nas espécies do Brasil extra-amazônico.** Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 233p.
- [22] FERREIRA DANTAS GP, NASCIMENTO MARTINS EMD, GOMIDES LS, CHEQUER FMD, BURBANO RR, FURTADO CA, SANTOS AP, TAGLIATI CA. **Pyrene-polyethylene glycol-modified multi-walled carbon nanotubes: Genotoxicity in V79-4 fibroblast cells.** *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen.* 2022 Apr-May;876-877:503463. doi: 10.1016/j.mrgentox.2022.503463. Epub 2022 Feb 11. PMID: 35483786.
- [23] AARDEMA MJ, GALLOWAY S, ZEIGER E, CIMINO MC, HAYASHI M. 2011. **Guidance for understanding solubility as a limiting factor for selecting the upper test concentration in the OECD in vitro micronucleus assay test guideline no. 487.** *Mutat Res* 722:89–90
- [24] OECD (2016), **Test No. 487: In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test**, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264264861-en>.
- [25] NICOLETTI, I., MIGLIORATI, G., PAGLIACCI, M.C., GRIGNANI, F. & RICCARDI, C. **A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry.** *J. Immunol. Methods* 139, 271–279 (1991).
- [26] MAURO, M., SILVA, R. M. DA ., CAMPOS, M. L. DE ., BAUERMEISTER, A., LOPES, N. P., & MORAES, N. V. DE .. (2021). **In vitro metabolism of copalic and kaurenoic acids in rat and human liver microsomes.** *Química Nova*, 44(Quím. Nova, 2021 44(6)), 700–708. <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170724>
- [27] FURTADO, R. A., DE OLIVEIRA, P. F., SENEDESE, J. M., OZELIN, S. D., DE SOUZA, L. D. R., LEANDRO, L. F., ... TAVARES, D. C. (2018). **Assessment of genotoxic activity of oleoresins and leaves extracts of six *Copaifera* species for prediction of potential human risks.** *Journal of Ethnopharmacology*, 221, 119–125. doi:10.1016/j.jep.2018.04.002
- [28] WANG Y, SU C, ZHANG B, NIU Y, REN R, ZHAO X, YANG L, ZHANG W, MA X. **Biological Activity, Hepatotoxicity, and Structure-Activity Relationship of Kavalactones and Flavokavins, the Two Main Bioactive Components in Kava (*Piper methysticum*).** *Evid Based Complement Alternat Med.* 2021 Aug 20;2021:6851798. doi: 10.1155/2021/6851798. PMID: 34471418; PMCID: PMC8405297.

- [29] KU WW, BIGGER A, BRAMBILLA G, GLATT H, GOCKE E, GUZZIE PJ, HAKURA A, HONMA M, MARTUS HJ, OBACH RS, ROBERTS S; STRATEGY EXPERT GROUP, IWGT. **Strategy for genotoxicity testing--metabolic considerations.** *Mutat Res.* 2007 Feb 3;627(1):59-77. doi: 10.1016/j.mrgentox.2006.10.004. Epub 2006 Dec 1. PMID: 17141553.
- [30] OOKA M, LYNCH C, XIA M. **Application of In Vitro Metabolism Activation in High-Throughput Screening.** *Int J Mol Sci.* 2020 Oct 31;21(21):8182. doi: 10.3390/ijms21218182. PMID: 33142951; PMCID: PMC7663506.
- [31] PINTO, A.C.; BRAGA, W.F.; REZENDE, C.M.; GARRIDO, F.M.S.; VEIGA JUNIOR, V.F.; BEGTER, L.; PATITUCCI, M.L.; ANTUNES, O.A.C. **Separation of Acid Diterpenes of *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke by Flash Chromatography Using Potassium Hydroxide Impregnated Silica Gel.** *J Braz Chem Soc*, v.11, n.4, p. 355- 360, 2000.
- [32] VEIGA JUNIOR, V.F. 2004. O Gênero *Copaifera*: Estudos Fitoquímicos de espécies classificadas e de 127 Óleos de *Copaíba*. 400f. Tese (Doutorado em Química Orgânica) – Instituto de Química, UFRJ, Rio de Janeiro
- [33] CASTRO, PLP. **Farmacocinética do paracetamol.** Universidade Fernando Pessoa. (Dissertação de Mestrado). 2014.
- [34] JIANG, X. L., ET AL. (2013). **Application of physiologically based pharmacokinetic modeling to predict acetaminophen metabolism and pharmacokinetics in children.** *CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol*, 2, pp. e80.
- [35] CANELHAS, B B. **Estudo químico, análise do óleo essencial e avaliação das atividades antioxidante e antibacteriana do Marmelinho [*Cordia sessilis* (Vell.) Kuntze (Rubiaceae)].** Universidade Federal de Uberlândia. (Dissertação de Mestrado). 2012.
- [36] PAVAN E, DAMAZO A.S., LEMOS L.M.S., ADZU B., BALOGUN S.O., ARUNACHALAM K, MARTINS D.T.O. **Evaluation of genotoxicity and subchronic toxicity of the standardized leaves infusion extract of *Copaifera malmei* Harms in experimental models.** *J Ethnopharmacol.* 2018 Jan 30;211:70-77. doi: 10.1016/j.jep.2017.09.027. Epub 2017 Sep 21. PMID: 2894344
- [37] DAMASCENO JL, ARNET YF, FORTUNATO GC, GIROTTO L, MARENA GD, ROCHA BP, RESENDE FA, AMBROSIO SR, VENEZIANI RCS, BASTOS JK, MARTINS CHG. **Investigation of Safety Profile of Four *Copaifera* Species and of Kaurenoic Acid by Salmonella/Microsome Test.** *Evid Based Complement Alternat Med.* 2019 Jan 10;2019:7631531. doi: 10.1155/2019/7631531. PMID: 30733813; PMCID: PMC6348810
- [38] CHOUDHURI, S., KAUR, T., JAIN, S., SHARMA, C., & ASTHANA, S. (2021). **A review on genotoxicity in connection to infertility and cancer.** *Chemico-biological interactions*, 345, 109531. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2021.109531>.
- [39] CORVI R, MADIA F. **In vitro genotoxicity testing-Can the performance be enhanced?** *Food Chem Toxicol.* 2017 Aug;106(Pt B):600-608. doi: 10.1016/j.fct.2016.08.024. Epub 2016 Aug 21. PMID: 27554597.
- [40] D'Arcy MS. **Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy.** *Cell Biol Int.* 2019 Jun;43(6):582-592. doi: 10.1002/cbin.11137. Epub 2019 Apr 25. PMID: 30958602.
- [41] Urasaki Y, Beaumont C, Workman M, Talbot JN, Hill DK, Le TT. **Fast-Acting and Receptor-Mediated Regulation of Neuronal Signaling Pathways by *Copaiba* Essential Oil.** *Int J Mol Sci.* 2020 Mar 25;21(7):2259. doi: 10.3390/ijms21072259. PMID: 32218156; PMCID: PMC7177672.
- [42] DARROUDI, F; EHRLICH, V; WUILLOT, A; DUBOIS, T; KNASMUELLER, S; MERSCH-SUNDERMANN, V; MERSCH-SUNDERMANN. CHAPTER 7 - **Testing for Food Safety Using Competent Human Liver Cells.** *Year. Ensuring Global Food Safety*, Academic Press, 2010, Pages 125-138, ISBN 9780123748454, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374845-4.00007-2>.

- [43] GALLOWAY S, LORGE E, AARDEMA MJ, EASTMOND D, FELLOWS M, HEFLICH R, KIRKLAND D, LEVY DD, LYNCH AM, MARZIN D, et al. 2011. **Workshop summary: Top concentration for in vitro mammalian cell genotoxicity assays; and Report from working group on toxicity measures and top concentration for in vitro cytogenetics assays (chromosome aberrations and micronucleus)**. *Mutat Res* 723:77–8
- [44] MORGUETE AEB, BIGOTTO BG, VARELLA RL, ANDRIANI GM, SPOLADORI LFA, PEREIRA PML, DE ANDRADE FG, LANCHEROS CAC, NAKAMURA CV, SYOGO ARAKAWA N, BRUSCHI ML, CARLOS TOMAZ J, LONNI AASG, KERBAUY G, TAVARES ER, YAMAUCHI LM, YAMADA-OGATTA SF. **Hydrogel Containing Oleoresin From *Copaifera officinalis* Presents Antibacterial Activity Against *Streptococcus agalactiae***. *Front Microbiol.* 2019 Dec 4;10:2806. doi: 10.3389/fmicb.2019.02806. PMID: 31866975; PMCID: PMC6904337.
- [45] SUN Y, LIU Y, MA X, HU H. **The Influence of Cell Cycle Regulation on Chemotherapy**. *Int J Mol Sci.* 2021 Jun 28;22(13):6923. doi: 10.3390/ijms22136923. PMID: 34203270; PMCID: PMC8267727.
- [46] KOVÁCS R, CSENKI Z, BAKOS K, URBÁNYI B, HORVÁTH Á, GARAJ-VRHOVAC V, GAJSKI G, GERIĆ M, NEGREIRA N, LÓPEZ DE ALDA M, BARCELÓ D, HEATH E, KOSJEK T, ŽEGURA B, NOVAK M, ZAJC I, BAEBLER Š, ROTTER A, RAMŠAK Ž, FILIPIČ M. **Assessment of toxicity and genotoxicity of low doses of 5-fluorouracil in zebrafish (*Danio rerio*) two-generation study**. *Water Res.* 2015 Jun 15;77:201-212. doi: 10.1016/j.watres.2015.03.025. Epub 2015 Apr 3. PMID: 25889180.
- [47] DOGAN M, KARABULUT HG, TUKUN A, DEMIRKAZIK A, UTKAN G, YALCIN B, DINCOL D, AKBULUT H, ICLI F. **Relationship between antimetabolite toxicity and pharmacogenetics in Turkish cancer patients**. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2012;13(4):1553-6. doi: 10.7314/apjcp.2012.13.4.1553. PMID: 22799365.
- [48] PADMANABHAN, S., TRIPATHI, D. N., VIKRAM, A., RAMARAO, P., & JENA, G. B. (2008). **Cytotoxic and genotoxic effects of methotrexate in germ cells of male Swiss mice**. *Mutation research/genetic toxicology and environmental mutagenesis*, 655(1-2), 59-67.
- [49] Kang, K., Lee, S. B., Yoo, J. H., & Nho, C. W. (2010). **Flow cytometric fluorescence pulse width analysis of etoposide-induced nuclear enlargement in HCT116 cells**. *Biotechnology letters*, 32, 1045-1052.
- [50] SOUZA, V.C. AND LORENZI, H. (2012). *Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG III*. Instituto Plantarum de Estudos da Flora.
- [51] LORENZI, H., MATOS, F.J., AND ANDRADE, E. (2008). *Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas*. Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda.
- [52] SOUZA, S.M., ET AL. (2020). *Chemical and biological assessment of *Copaifera multijuga* (Fabaceae) Oleoresin*. *Natural Product Research*, 1-7.

4. PERSPECTIVAS

- Analisar a capacidade do óleo resina de *Copaifera multijuga* Hayne e hidrogel polimérico de induzir danos no DNA e/ou alterar o ciclo celular da linhagem celular HepG2 por citometria de fluxo;
- Elucidar os mecanismos de morte celular do óleo resina de copaíba com ativação e sem ativação metabólica, realizando os ensaio de lactato desidrogenase (LDH) e Anexina-iodeto de propídio;
- Realizar teste de mutagenicidade seguindo as diretrizes da OECD 471 “Teste de Ames”.

REFERÊNCIAS

- ABU-BAKAR A, TAN BH, HALIM H, RAMLI S, PAN Y, ONG CE. **Cytochromes P450: Role in Carcinogenesis and Relevance to Cancers.** *Curr Drug Metab.* 2022 Aug 3;23(5):355-373. doi: 10.2174/1389200223666220328143828. PMID: 35345986.
- AARDEMA MJ, GALLOWAY S, ZEIGER E, CIMINO MC, HAYASHI M. 2011. **Guidance for understanding solubility as a limiting factor for selecting the upper test concentration in the OECD in vitro micronucleus assay test guideline no. 487.** *Mutat Res* 722:89–90
- ALVES JM, SENEDESE JM, LEANDRO LF, CASTRO PT, PEREIRA DE, CARNEIRO LJ, AMBRÓSIO SR, BASTOS JK, TAVARES DC. **Copaifera multijuga oleoresin and its constituent diterpene (–)-copalic acid: Genotoxicity and chemoprevention study.** *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen.* 2017 Jul;819:26-30. doi: 10.1016/j.mrgentox.2017.05.001. Epub 2017 May 3. PMID: 28622827.
- ALVES JM, LEANDRO LF, SENEDESE JM, CASTRO PT, PEREIRA DE, RESENDE FA, CAMPOS DL, SILVA JJM, VARANDA EA, BASTOS JK, AMBRÓSIO SR, TAVARES DC (2018) **Antigenotoxicity properties of Copaifera multijuga oleoresin and its chemical marker, the diterpene (–)-copalic acid.** *J Toxicol Environ Health A* 81:116–129. <https://doi.org/10.1080/15287394.2017.1420505>
- AOKI S, TAKEZAWA T, SUGIHARA H, TODA S. **Progress in cell culture systems for pathological research.** *Pathol Int.* 2016 Oct;66(10):554-562. doi: 10.1111/pin.12443. Epub 2016 Jul 31. PMID: 27477924.
- ARAÚJO, G. L. DE, CAMPOS, M. A. A., VALENTE, M. A. S, SILVA, S. C. T., FRANÇA, F. D., CHAVES, M. M. , TAGLIATI, C.A . **Alternative methods in toxicity testing: the current approach** . *Braz. J. Pharm. Sci.* [Internet]. 2014Mar.1 [cited 2023Jan.6];50(1):55-62. Available from: <https://www.revistas.usp.br/bjps/article/view/80850>
- BADERNA, D., GADALETA, D., LOSTAGLIO, E., SELVESTREL, G., RAITANO, G., GOLBAMAKI, A., LOMBARDO, A., & BENFENATI, E. (2020). **New in silico models to predict in vitro micronucleus induction as marker of genotoxicity.** *Journal of hazardous materials*, 385, 121638.
- BAUST, J. M., BUEHRING, G. C., CAMPBELL, L., ELMORE, E., HARBELL, J. W., NIMS, R. W., ... SIMIONE, F. (2017). **Best practices in cell culture: an overview.** *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal*, 53(8), 669–672. doi:10.1007/s11626-017-0177-7
- BIGGER, C., TOMASZEWSKI, J., DIPPLE, A., & LAKE, R. (1980). **Limitations of metabolic activation systems used with in vitro tests for carcinogens.** *Science*, 209(4455), 503–505. doi:10.1126/science.6771871
- BRADLEY MO, BHUYAN B, FRANCIS MC, LANGENBACH R, PETERSON A, HUBERMAN E. **Mutagenesis by chemical agents in V79 chinese hamster cells: a review and analysis of the literature. A report of the Gene-Tox Program.** *Mutat Res.* 1981 Sep;87(2):81-142. doi: 10.1016/0165-1110(81)90029-4. PMID: 7035931.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – (ANVISA). RE no 90, de 16 de março de 2004. **Dispõe sobre o Guia para a realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos.** D.O.U.-Diário Oficial da União, Brasília-DF, 18 de março de 2004. <https://www.diariodasleis.com.br/busca/exibelink.php?numlink=1-9-34-2004-03-16-90>
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – (ANVISA). MEDICAMENTOS – GUIA no 22, versão 1, de 17 de junho de 2019. **Dispõe sobre o estudos não clínicos necessários ao desenvolvimento de medicamentos fitoterápicos e produtos tradicionais fitoterápicos** .D.O.U.-Diário Oficial da União, Brasília-DF, 17 de junho de 2019.
- BRASIL. Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008. **Regulamenta o inciso VII do § 1º do art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais; revoga a Lei nº 6.638,**

de 8 de maio de 1979; e dá outras providências.
http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2007-2010/2008/Lei/L11794.htm.

BRASIL. Ministério da Saúde. RDC Nº 26, de 13 de maio de 2014. **Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos**. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 13 maio 2014. https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2014/rdc0026_13_05_2014.pdf

BRUNING, M. C. R.; MOSEGUI, G. B. G.; VIANNA, C. M. M. (2012). **A utilização da fitoterapia e de plantas medicinais em unidades básicas de saúde nos municípios de Cascavel e Foz do Iguaçu - Paraná: a visão dos profissionais de saúde**. *Ciência & Saúde Coletiva*, 17(10), 2675-85.

CANELHAS, Bruno Borges. **Estudo químico, análise do óleo essencial e avaliação das atividades antioxidante e antibacteriana do Marmelinho [Cordia sessilis (Vell.) Kuntze (Rubiaceae)]**. Universidade Federal de Uberlândia. (Dissertação de Mestrado). 2012.

CARIAS, R.B.V. (2017). **Obtenção e Estabelecimento de Culturas de Células Humanas, Definição da Qualidade e de uso em "Biometrologia"**. 2017, 181 f. Dissertação. Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia - Inmetro.

CARVALHO, ABC, et al. **The Brazilian market of herbal medicinal products and the impacts of the new legislation on traditional medicines**. *Journal of Ethnopharmacology* 212 (2018) 29–35

CAVALCANTI, B. C. **Avaliação do potencial genotóxico e mutagênico do ácido kaurenóico, um diterpeno isolado da planta Copaifera Langsdorffii Desf. (Leguminosae)**. 2006. 95 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.

CAVALCANTI, B. C., COSTA-LOTUFO, L. V., MORAES, M. O., BURBANO, R. R., SILVEIRA, E. R., CUNHA, K. M. A., ... PESSOA, C. (2006). **Genotoxicity evaluation of kaurenoic acid, a bioactive diterpenoid present in Copaiba oil**. *Food and Chemical Toxicology*, 44(3), 388–392. doi:10.1016/j.fct.2005.08.011.

CAVALCANTI, B. C., BEZERRA, D. P., MAGALHÃES, H. I., MORAES, M. O., LIMA, M. A., SILVEIRA, E. R., CÂMARA, C. A., RAO, V. S., PESSOA, C., & COSTA-LOTUFO, L. V. (2009). **Kauren-19-oic acid induces DNA damage followed by apoptosis in human leukemia cells**. *Journal of applied toxicology : JAT*, 29(7), 560–568. <https://doi.org/10.1002/jat.1439>

CARDOSO P.C.D.S, ROCHA C.A.M.D, LEAL M.F, BAHIA M.O, ALCÂNTARA D.D.F.Á., SANTOS R.A.D, GONÇALVES N.D.S, AMBRÓSIO S.R., CAVALCANTI B.C., MOREIRA-NUNES C.A, PESSOA C.D.Ó, BURBANO R.M.R. **Effect of diterpenoid kaurenoic acid on genotoxicity and cell cycle progression in gastric cancer cell lines**. *Biomed Pharmacother*. 2017 May;89:772-780. doi: 10.1016/j.biopha.2017.02.085. Epub 2017 Mar 6. PMID: 28273639.

CARVALHO, A. C. B., BALBINO, E. E., MACIEL, A. & PERFEITO, J. P. S. (2008). **Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil**. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 18(2), 314–319. <https://doi.org/10.1590/s0102-695x2008000200028>

CAZARIN, K. C. C.; CORRÊA, C. L.; ZAMBRONE, F. A. D. **Redução, refinamento e substituição do uso de animais em estudos toxicológicos: uma abordagem atual**. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 40, n. 3, p. 289–299, Sep. 2004.

CHEN-CHEN, L. and SENA, MA., 2002. **Atividade tóxica e mutagênica do óleo de copaíba (Copaifera langsdorffii Desfon) em camundongos**. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, vol. 5, no. 1, p. 37-40.

CHI, L. H., BURROWS, A. D., & ANDERSON, R. L. (2022). **Can preclinical drug development help to predict adverse events in clinical trials?**. *Drug discovery today*, 27(1), 257–268. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2021.08.010>

CHOUDHURI, S., KAUR, T., JAIN, S., SHARMA, C., & ASTHANA, S. (2021). A review on genotoxicity in connection to infertility and cancer. *Chemico-biological interactions*, 345, 109531. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2021.109531>

CORVI R, MADIA F. **In vitro genotoxicity testing-Can the performance be enhanced?** *Food Chem Toxicol.* 2017 Aug;106(Pt B):600-608. doi: 10.1016/j.fct.2016.08.024. Epub 2016 Aug 21. PMID: 27554597.

COSTA, J. 2007. **Estudos taxonômicos, biosistemáticos e filogenéticos em *Copaifera L. (Leguminosae – Detariceae)* com ênfase nas espécies do Brasil extra-amazônico.** Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 233p.

COSTA-LOTUFO, L.V.; CUNHA, G.M.A.; FARIAS, P.A.M.; VIANA, G.S.B.; CUNHA, K.M.A.; PESSOA, C.; MORAES, M.O.; SILVEIRA, E.R.; GRAMOSA, N.V.; RAO, V.S.N. **The Cytotoxic and Embryotoxic Effects of Kaurenoic Acid, a Diterpene Isolated from *Copaifera langsdorffii* Oleo-resin.** *Toxicon*, v.40, p.1231-1234, 2002.

CORRAL-VÁZQUEZ C, AGUILAR-QUESADA R, CATALINA P, LUCENA-AGUILAR G, LIGERO G, MIRANDA B, CARRILLO-ÁVILA JA. **Cell lines authentication and mycoplasma detection as minimum quality control of cell lines in biobanking.** *Cell Tissue Bank.* 2017 Jun;18(2):271-280. doi: 10.1007/s10561-017-9617-6. Epub 2017 Mar 2. PMID: 28255773; PMCID: PMC5429902.

CRUZ, Marina Sampaio de Menezes. **Investigação da toxicidade genética de produtos naturais através de bioensaios de curta duração .** 2015. 2775f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Centro de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2015.

DANTAS, G. P. F. (2018). **Avaliação da segurança in vitro de nanotubos de carbono de paredes múltiplas funcionalizados com polietilenoglicol em linhagem de fibroblasto de pulmão de hamster (V79-4)** <http://hdl.handle.net/1843/FARB-BCCJZX>.

DAMASCENO JL, ARNET YF, FORTUNATO GC, GIROTTO L, MARENA GD, ROCHA BP, RESENDE FA, AMBROSIO SR, VENEZIANI RCS, BASTOS JK, MARTINS CHG. **Investigation of Safety Profile of Four *Copaifera* Species and of Kaurenoic Acid by Salmonella/Microsome Test.** *Evid Based Complement Alternat Med.* 2019 Jan 10;2019:7631531. doi: 10.1155/2019/7631531. PMID: 30733813; PMCID: PMC6348810.

DA TRINDADE, R., DA SILVA, J. K., & SETZER, W. N. (2018). ***Copaifera* of the Neotropics: A Review of the Phytochemistry and Pharmacology.** *International journal of molecular sciences*, 19(5), 1511. <https://doi.org/10.3390/ijms19051511>.

DRIVER V.R.; FABBI, M.; LAVERY, L.A.; GIBBONS G. **The costs of diabetic foot: the economic case for the limb salvage team.** *J Am Podiatr Med Assoc.*;100(5):335–341, 2010.

DUARTE, C. C.; ALMEIDA, C. F. S. C.; PEREIRA, W. E.; ALEMÃO, M. M.; BRANDÃO, C. M. R.; BORGES, E. LI. **Custos do tratamento tópico de pacientes com úlcera por pressão.** *Rev Esc Enferm USP*; 50(2):295-301, 2016.

DWYER, J. 1951. **The Central American, West Indian, and South American species of *Copaifera* (Caesalpinioideae).** *Brittonia*, 7: 143–172.

ESTEVES, C. O.; RODRIGUES, R. M.; MARTINS, A. L. D.; VIEIRA, R. de A.; BARBOSA, J. L.; VILELA, J. B. F. **Medicamentos fitoterápicos: prevalência, vantagens e desvantagens de uso na prática clínica e perfil e avaliação dos usuários.** *Revista de Medicina*, [S. l.], v. 99, n. 5, p. 463-472, 2020. DOI: 10.11606/issn.1679-9836.v99i5p463-472. Disponível em: <https://www.revistas.usp.br/revistadc/article/view/160705>. Acesso em: 11 fev. 2022.

FAGUNDES, F. A.; et al. ***Annona coriacea* induz efeito genotóxico em camundongos.** *Revista Eletrônica de Farmácia*. v. 2, n.1, p. 24-29, 2005.

FERRAZ, Elisa Raquel Anastácio. **Comparação da mutagenicidade dos azo corantes Disperse Red 1, Disperse Orange 1 e Disperse Red 13 utilizando o teste de mutagenicidade com 'Salmonella'.** 2008.

Dissertação (Mestrado em Toxicologia) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Université de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008. doi:10.11606/D.60.2008.tde-02092008-160549. Acesso em: 2022-02-11.

FIDALGO, O. & BONONI, V.L. 1984. **Técnicas de coleta, preservação e herborização de material botânico**. Instituto de Botânica, São Paulo, 62 p.

FLORES, M.; YAMAGUCHI, M.U. **Teste de micronúcleo: uma triagem para avaliação genotóxica**, Revista Saúde e Pesquisa, v.1, n.3, p. 337-340, 2008

FREEDMAN LP, COCKBURN IM, SIMCOE TS. **The Economics of Reproducibility in Preclinical Research**. PLoS Biol. 2015 Jun 9;13(6):e1002165. doi: 10.1371/journal.pbio.1002165. Erratum in: PLoS Biol. 2018 Apr 10;16(4):e1002626. PMID: 26057340; PMCID: PMC4461318.

FREIRES, I. A. et al. **Alternative Animal and Non-Animal Models for Drug Discovery and Development: Bonus or Burden?** Pharmaceutical Research, v. 34, n. 4, p. 681–686, Apr. 2017.

FURTADO, R. A., DE OLIVEIRA, P. F., SENEDESE, J. M., OZELIN, S. D., DE SOUZA, L. D. R., LEANDRO, L. F., ... TAVARES, D. C. (2018). **Assessment of genotoxic activity of oleoresins and leaves extracts of six Copaifera species for prediction of potential human risks**. Journal of Ethnopharmacology, 221, 119–125. doi:10.1016/j.jep.2018.04.002

GARTLER SM (1968) **Apparent Hela cell contamination of human heteroploid cell lines**. Nature 217: 750–751 [PubMed] [Google Scholar]

GERAGHTY RJ, CAPES-DAVIS A, DAVIS JM, DOWNWARD J, FRESHNEY RI, KNEZEVIC I, LOVELL-BADGE R, MASTERS JR, MEREDITH J, STACEY GN et al (2014) **Guidelines for the use of cell lines in biomedical research**. Br J Cancer 111: 1021–1046 [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]

GENTILE, C. **Filling the Gaps between the In Vivo and In Vitro Microenvironment: Engineering of Spheroids for Stem Cell Technology**. Current stem cell research & therapy, v. 11, n. 8, p. 652–665, 2016.

GUENGERICH, F.P. (2008). **Cytochrome P450 and chemical toxicology**. Chem. Res. Toxicol. 2008, 21, 70–83.

GÚIDO, R. V. C.; et al. **Diminuição da atividade mutagênica do pró-fármaco NFOH-121 em relação ao nitrofuril (nitrofurazona)**. Revista de Ciências Farmacêuticas. v. 22, n. 2, p. 319-333, 2001.

GUIMARÃES, M. V, FREIRE, J.E.C. E MENEZES, L.M.B. **Utilização de animais em pesquisas: breve revisão da legislação no Brasil**. Revista Bioética [online]. 2016, v. 24, n. 2 [Acessado 24 Novembro 2022], pp. 217-224. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/1983-80422016242121>>. ISSN 1983-8034. <https://doi.org/10.1590/1983-80422016242121>.

HACKAM, D. G., & REDELMEIER, D. A. (2006). **Translation of research evidence from animals to humans**. JAMA, 296(14), 1731–1732. <https://doi.org/10.1001/jama.296.14.1731>

JAYASINGHE, CHANIKA & DE MEL, YASARA & PERERA, SASHINI & RATNAWEERA, PAMODA. (2017). **Novel insights of toxicological evaluation of herbal medicine: Human-based toxicological assays**. Asian Journal of Pharmacy and Pharmacology. 3. 41-49.

JORDAN, S.A, CUNNINGHAM, D. G, MARLES, R.J.(2010). **Assessment of herbal medicinal products: challenges, and opportunities to increase the knowledge base for safety assessment**. Toxicology and Applied Pharmacology, 1;243(2):198-216

JOYCE, B. L., AL-AHMAD, H., CHEN, F., & STEWART, C. N. (2012). **Diesel Trees. Handbook of Bioenergy Crop Plants**; Kole, C., Joshi, CP, Shonnard, DR, Eds, 619-629.

KANT, V.; GOPALA, A.; KUMARA, D.; GOPALKRISHNANA, A.; NITYA,N.; PATHAKA,N. P. K.; TANDANA, S. K.; KUMARA, D. **Topical pluronic F-127 gel application enhances cutaneous wound healing in rats**. Acta Histochemica, 116, p. 5–13, 2013.

KISURINA-EVGENIEVA OP, SUTIAGINA OI, ONISHCHENKO GE. **Biogenesis of Micronuclei**. *Biochemistry (Mosc)*. 2016 May;81(5):453-64. doi: 10.1134/S0006297916050035. PMID: 27297896.

KRAMER, J. A., SAGARTZ, J. E., & MORRIS, D. L. (2007). **The application of discovery toxicology and pathology towards the design of safer pharmaceutical lead candidates**. *Nature reviews. Drug discovery*, 6(8), 636–649. <https://doi.org/10.1038/nrd2378>

LAMAN, J. & KOOISTRA, S. & CLAUSEN, B. (2017). *Reproducibility Issues: Avoiding Pitfalls in Animal Inflammation Models*. 10.1007/978-1-4939-6786-5_1.

KRANENDONK, M.; LAIRES, A.; RUEFF, J.; ESTABROOK, R.W. and VERMEULEN NPE. **Heterologous expression of xenobiotic mammalian-metabolizing enzymes in mutagenicity test bacteria: an update and practical considerations**. *Crit. Rev. Toxicol*, Cleveland, v. 30, p.287-306.2000, 2007.

KRUPINA K, GOGINASHVILI A, CLEVELAND DW. **Causes and consequences of micronuclei**. *Curr Opin Cell Biol*. 2021 Jun;70:91-99. doi: 10.1016/j.ceb.2021.01.004. Epub 2021 Feb 18. PMID: 33610905; PMCID: PMC8119331.

KU WW, BIGGER A, BRAMBILLA G, GLATT H, GOCKE E, GUZZIE PJ, HAKURA A, HONMA M, MARTUS HJ, OBACH RS, ROBERTS S; STRATEGY EXPERT GROUP, IWGT. **Strategy for genotoxicity testing--metabolic considerations**. *Mutat Res*. 2007 Feb 3;627(1):59-77. doi: 10.1016/j.mrgentox.2006.10.004. Epub 2006 Dec 1. PMID: 17141553.

LEVY A, ALBIGES-SAUVIN L, MASSARD C, SORIA JC, DEUTSCH E. **Cycle cellulaire, mitose et applications thérapeutiques [Cell cycle, mitosis and therapeutic applications]**. *Bull Cancer*. 2011 Oct;98(9):1037-45. French. doi: 10.1684/bdc.2011.1382. PMID: 21669563.

LORENZI, H. & MATOS, F. J. de A. (2008). **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum.

LOW, L. A., MUMMERY, C., BERRIDGE, B. R., AUSTIN, C. P., & TAGLE, D. A. (2021). **Organs-on-chips: into the next decade**. *Nature reviews. Drug discovery*, 20(5), 345–361. <https://doi.org/10.1038/s41573-020-0079-3>.

LPWG-The Legume Phylogeny Working Group. 2017. **A new subfamily classification of the Leguminosae based on a taxonomically comprehensive phylogeny: The Legume Phylogeny Working Group (LPWG)**. *Taxon*, 66: 44–77.

MACIEL, E. A. F. **Prevalência de feridas em pacientes internados em um hospital filantrópico de grande porte de Belo Horizonte**. Dissertação (Mestrado). Escola de Enfermagem, Universidade Federal de Minas Gerais, 2008.

MAGUTU T. (2022). **Compounding with Pracaxi Versus Copaiba Oil**. *International journal of pharmaceutical compounding*, 26(4), 277–281.

MARTINI, C. A. N.; SCAPINI, J. G. S.; COLLAÇO, L. M.; MATSUBARA, A.; VEIGA JUNIOR, V. F. **Análise comparativa dos efeitos do óleo-resina de Copaifera multijuga e da nitrofurazona na cicatrização de ferida cutânea**. *Rev. Col. Bras. Cir.*; 43(6): 445-451, 2016.

MARTINS-DA-SILVA, R. C. V.; PEREIRA, J. F. & LIMA, H. C. **O gênero copaifera (leguminosae – caesalpinioideae) na amazônia brasileira**. *Rodriguésia* 59 (3): 455-476, 2008.

MARTINS-DA-SILVA, R.; PEREIRA, J.; LIMA, H. 2008. **O gênero Copaifera (Leguminosae –Caesalpinioideae) na Amazônia brasileira**. *Rodriguésia*, 59: 455–476.

MEINTIÈRES, S., BIOLA, A., PALLARDY, M., & MARZIN, D. (2001). **Apoptosis can be a confusing factor in in vitro clastogenic assays**. *Mutagenesis*, 16(3), 243–250. <https://doi.org/10.1093/mutage/16.3.243>

MEINTIÈRES, S., & MARZIN, D. (2004). **Apoptosis may contribute to false-positive results in the in vitro micronucleus test performed in extreme osmolality, ionic strength and pH conditions.** *Mutation research*, 560(2), 101–118. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2004.02.003>

MIGITA, N.A. (2012). **Cultivo celular in vitro: importância para a pesquisa biomédica e dimensão da problemática de autenticação de linhagens celulares.** Universidade Estadual Paulista (Unesp)

MONTES, L.V.; BROSEGHINI, L.P., ANDREATTA, F.S., SANT'ANNA, M.E.S.; NEVES, V.M.; SILVA, A.G. **Evidências para o uso da óleo-resina de copaíba na cicatrização deferida – uma revisão sistemática.** *Natureza on line* 7 (2): 61- 67, 2009.

MORAIS, G.F.C. et al. **Avaliação de feridas pelos enfermeiros de instituições hospitalares da rede pública.** *Texto contexto - enferm.*, Florianópolis , v. 17, n. 1, p. 98-105, Mar. 2008.

MARON, M & AMES, B. **Revised methods for the Salmonella mutagenicity test, Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects**, Volume 113, Issues 3–4, 1983, Pages 173-215, ISSN 0165-1161, [https://doi.org/10.1016/0165-1161\(83\)90010-9](https://doi.org/10.1016/0165-1161(83)90010-9). (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0165116183900109>)

NOVAIS, T. S.; COSTA, J. F. O.; DAVID, J. P. D. L.; DAVID, J. M.; QUEIROZ, L. P. D.; FRANÇA, F.; SANTOS, R. R. D. **Atividade antibacteriana em alguns extratos de vegetais do semi-árido brasileiro.** *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 13, p. 5-8, 2003.

OECD (2016), **Test No. 487: In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test**, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264264861-en>.

OECD (2020), **Test No. 471: Bacterial Reverse Mutation Test**, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264071247-en>.

OOKA M, LYNCH C, XIA M. **Application of In Vitro Metabolism Activation in High-Throughput Screening.** *Int J Mol Sci.* 2020 Oct 31;21(21):8182. doi: 10.3390/ijms21218182. PMID: 33142951; PMCID: PMC7663506.

PAIVA, L.A; DE ALENCAR CUNHA K.M.; SANTOS F.A.; GRAMOSA N.V.; SILVEIRA, E.R., RAO, V.S. **Investigation on the wound healing activity of oleo-resin from *Copaifera langsdorffii* in rats.** *Phytotherapy Research* 16 (8): 737-9, 2002

PAVAN E, DAMAZO A.S., LEMOS L.M.S., ADZU B., BALOGUN S.O., ARUNACHALAM K, MARTINS D.T.O. **Evaluation of genotoxicity and subchronic toxicity of the standardized leaves infusion extract of *Copaifera malmey* Harms in experimental models.** *J Ethnopharmacol.* 2018 Jan 30;211:70-77. doi: 10.1016/j.jep.2017.09.027. Epub 2017 Sep 21. PMID: 28943446.

PAWLOWSKI, Â; KALTCHUK-SANTOS, E.; ZINI, C. A.; CAMARÃO, E. B.; SOARES, G.L. G. **Essential oils of *Schinus terebinthifolius* and *S. molle* (Anacardiaceae): Mitodepressive and aneugenic inducers in onion and lettuce root meristems.** *South african journal of botany*, v.80, p.96-103, 2012.

PETTA, T. B. et al. **Genotoxicity induced by saponified coconut oil surfactant in prokaryote systems.** *Mutagenesis*, v. 19, p. 441-444, 2004

PINTO, A.C.; BRAGA, W.F.; REZENDE, C.M.; GARRIDO, F.M.S.; VEIGA JUNIOR, V.F.; BEGTER, L.; PATITUCCI, M.L.; ANTUNES, O.A.C. **Separation of Acid Diterpenes of *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke by Flash Chromatography Using Potassium Hydroxide Impregnated Silica Gel.** *J Braz Chem Soc*, v.11, n.4, p. 355- 360, 2000.

REIMANN, HAUKE; STOPPER, HELGA; HINTZSCHE, HENNING (2020). **Long-term fate of etoposide-induced micronuclei and micronucleated cells in Hela-H2B-GFP cells.** *Archives of Toxicology*, (). doi:10.1007/s00204-020-02840-0

RIOS, M.N.D.S.; Pastore Junior, F. **Plantas da Amazônia: 450 Espécies de Uso Geral**; Universidade de Brasília: Brasília, Brazil, 2011. [Google Scholar]

ROBINSON NB, KRIEGER K, KHAN FM, HUFFMAN W, CHANG M, NAIK A, YONGLE R, HAMEED I, KRIEGER K, GIRARDI LN, GAUDINO M. **The current state of animal models in research: A review**. *Int J Surg*. 2019 Dec;72:9-13. doi: 10.1016/j.ijssu.2019.10.015. Epub 2019 Oct 15. PMID: 31627013.

ROOS, WYNAND P.; THOMAS, ADAM D.; KAINA, BERND (2015). **DNA damage and the balance between survival and death in cancer biology**. *Nature Reviews Cancer*, (), -. doi:10.1038/nrc.2015.2

ROSA, R. M. (2008) **Cytotoxicity, genotoxicity and mutagenic potential for diphenyl diselenite in mammalian cells**. Thesis presented to the postgraduate program in Biological Sciences: Biochemistry of the Federal University of Rio Grande do Sul.

RUSSELL, W .M. S & BURCH, R. L.(1959) **The principles of humane experimental technique**. London: Methuen & Co. Limited. 8½" × 5½", pp. 252. Price: 30s. (English).

SANTOS, VARANDA , LIMA , CHIN.**Evaluation of thalidomide mutagenic activity by Ames test**.ISSN 1808- 1808 - 0804Vol. IV (2),(2) , 154-154 - 158,158 , 2007

SANTOS, P. E. et al. **Genotoxicity induced by Eugenia caryophyllata infusion**. *Journal of Toxicology and Environmental Health Part A*, v. 71, p. 439-444, 2008.

SEOK, J., WARREN, H. S., CUENCA, A. G., MINDRINOS, M. N., BAKER, H. V., XU, W., RICHARDS, D. R., MCDONALD-SMITH, G. P., GAO, H., HENNESSY, L., FINNERTY, C. C., LÓPEZ, C. M., HONARI, S., MOORE, E. E., MINEI, J. P., CUSCHIERI, J., BANKEY, P. E., JOHNSON, J. L., SPERRY, J., NATHENS, A. B., ... **Inflammation and Host Response to Injury, Large Scale Collaborative Research Program (2013). Genomic responses in mouse models poorly mimic human inflammatory diseases. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 110(9), 3507–3512. <https://doi.org/10.1073/pnas.1222878110>.

SILVA, FURTADO, OSORIO, MORAIS, AMARAL,COÊLHO & ARCANJO.(2021). **The importance of toxicity tests for development and phytotherapy registration**.*Research, Society and Development*, v. 10, n. 12, e538101220137, 2021 (CC BY 4.0) | ISSN 2525-3409 | DOI: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v10i12.20137>

SILVA, M. G. da .; FURTADO, M. M.; OSÓRIO, A. T. .; MORAIS, I. C. P. da S. .; AMARAL, M. P. M. do .; COÊLHO, A. G. .; ARCANJO, D. D. R. . **The importance of toxicity tests for development and phytotherapy registration**. *Research, Society and Development*, [S. l.], v. 10, n. 12, p. e538101220137, 2021. DOI: 10.33448/rsd-v10i12.20137. Disponível em: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/20137>. Acesso em: 11 feb. 2022.

SILVA, T.T.A. **Crítica à herança mecanicista de utilização animal: em busca de métodos alternativos**. *Anais do XVII Encontro Preparatório para o Congresso Nacional do Conpedi*. Florianópolis: Fundação Boiteux; 2008. p. 476-95.

SOURN NY, FUSENIG NE, HECK S, DIRKS WG, CAPES-DAVIS A, BIANCHINI F, PLASS C. **Cell line authentication: a necessity for reproducible biomedical research**. *EMBO J*. 2022 Jul 18;41(14):e111307. doi: 10.15252/embj.2022111307. Epub 2022 Jun 27. PMID: 35758134; PMCID: PMC9289526.

SPONCHIADO, G., ADAM, M. L., SILVA, C. D., SILVA SOLEY, B., DE MELLO-SAMPAYO, C., CABRINI, D. A., ... OTUKI, M. F. (2016). **Quantitative genotoxicity assays for analysis of medicinal plants: A systematic review**. *Journal of Ethnopharmacology*, 178, 289–296. doi:10.1016/j.jep.2015.10.026

TARGA, H. J & RABELLO-GAY . **Mutagenese, Teratogenese, Carcinogenese e O Uso de Alguns Praquicidas**. *REV. SRV. PUB. BRASILIA.*, p. 0-0, 2017.

TEIXEIRA, F. B.; SILVA, R. B.; LAMEIRA, O. A.; WEBBER, L. P.; D'ALMEIDA COUTO, R. S.; MARTINS, M. D.; LIMA, R. R. **Copaiba oil-resin (Copaifera reticulata Ducke) modulates the inflammation in a model of injury to rats' tongues**. *BMC Complement Altern Med.*; 17: 313, 2017.

TOMPKINS, L.; LYNCH, C.; HAIDAR, S.; POLLI, J.; WANG, H. **Effects of commonly used excipients on the expression of CYP3A4 in colon and liver cells.** *Pharm. Res.* 2010, 27, 1703–1712.

TURKEZ H, ARSLAN ME, OZDEMIR O. Genotoxicity testing: progress and prospects for the next decade. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2017 Oct;13(10):1089-1098. doi: 10.1080/17425255.2017.1375097. Epub 2017 Sep 10. PMID: 28889778.

UMBUZEIRO, G. A.; et al. **Teste de mutação reversa com *Salmonella typhimurium* [online].** Disponível:<http://www.sbmcta.org.br/?arq=doc01> [capturado em 23 julho 2007].

URASAKI Y, BEAUMONT C, TALBOT JN, HILL DK, LE TT.(2020a)**Akt3 Regulates the Tissue-Specific Response to Copaiba Essential Oil.** *Int J Mol Sci.* 2020 Apr 19;21(8):2851. doi: 10.3390/ijms21082851. PMID: 32325885; PMCID: PMC7216139.

URASAKI Y, BEAUMONT C, WORKMAN M, TALBOT JN, HILL DK, LE TT.(2020b).**Fast-Acting and Receptor-Mediated Regulation of Neuronal Signaling Pathways by Copaiba Essential Oil.** *Int J Mol Sci.* Mar 25;21(7):2259. doi: 10.3390/ijms21072259. PMID: 32218156; PMCID: PMC7177672.

VEIGA JUNIOR, V.F. 2004. **O Gênero *Copaifera*: Estudos Fitoquímicos de espécies classificadas e de 127 Óleos de Copaiba. 400f.** Tese (Doutorado em Química Orgânica) – Instituto de Química, UFRJ, Rio de Janeiro.

WU, Q. *et al.* **Organ-on-a-chip: recent breakthroughs and future prospects.** *Biomedical Engineering Online,* v. 19, n. 1, p. 9, 12 Feb. 2020.

APÊNDICE A-CLASSIFICAÇÃO BOTÂNICA DA *Copaifera multijuga*

Segundo o laudo emitido em 6 de agosto de 2021 pela Dra. Isolde Dorothea Kossmann Ferraz (Pesquisadora Titular do INPA, CRBio: 103122/06-D):

(...) As amostras recebidas e analisadas apresentaram todas as características inerentes à espécie *Copaifera multijuga* Hayne, apresentando folhas com 7–9 pares de folíolos, pecíolo e raque pubescentes, pecíolos variando de 0,6–1,3 cm e raque 6,6–15,3 cm comprimento. As amostras apresentaram cicatrizes das estípulas interpeciolares, típico nesta espécie. Os ramos apresentaram folíolos alternos, coriáceos, oblongo-lanceolados, assimétricos com base arredondada e ápice acuminado, sendo os folíolos medianos maiores que os distais e proximais. Lâmina glabra em ambas as faces e pubescente na nervura central, sendo observada a presença de pontuações translúcidas por toda a extensão da lâmina.

Data de coleta: 22/07/2021	Nomes populares: Copaiba-marimari, copaiba-jutairana, copaíba.	Identificador: Elzineide M. Carmo
Coordenadas: 07°46'31.7" S, 60°30'00.2" W, 87 m alt.	Família botânica: Fabaceae (Leguminosae)	Data de identificação: 02/08/2021
Nº de exemplares: 2	Subfamília: Detarioideae	Supervisor: Dra. Isolde D. K. Ferraz
Coletor: Marcelo do Amaral Jacaúna	Início das análises: 30/07/2021	Espécie identificada: <i>Copaifera multijuga</i> Hayne
Data de Entrada no Laboratório: 29/07/2021	Referências: Dwyer (1951); Costa (2007); Martins-da-Silva et al (2008)	

Fonte: Laudo Técnico INPA (2021)

Figura 5. Dados da coleta e a identificação das amostras

A quantificação dos fitoquímicos presentes no óleo de copaíba foi realizada pela Universidade Federal do Amazonas (UFAM). Foi utilizado um cromatógrafo gasoso (Thermo Scientific) com detector de massas (CG-EM), equipado com auto-amostrador (TriPlus RSH) e coluna capilar apolar (Tr-5; 30m x 0.25 mm ID x 0.25 µm). Inicialmente, o óleo foi derivatizado por reação *in situ*, usando o reagente de esterificação trimetilsilildiazometano (TMSD), para conversão dos ácidos diterpênicos em ésteres metílicos, metodologia descrita por Migowska e colaboradores (2010) com pequenas modificações.

Os fitoquímicos foram identificados por comparação dos seus índices de retenção (IR) com a literatura (ADAMS, 2007), pela co-injeção de padrões (β -cariofileno e α -humuleno) e por comparação dos perfis de fragmentação obtidos com a espectroteca Wiley 8a edição. O percentual de cada constituinte foi expresso em valores de concentração relativa (%) (tabela 1). As concentrações dos fitoquímicos do hidrogel polimérico foram estimados a partir da composição do óleo (tabela 1) e são evidenciadas na Tabela 2.

Tabela 1. Composição química média (triplicata) da oleorresina do Rio de Janeiro obtida por GC-MS (adaptado)

COMPONENT	RI (THEORETICAL)	RI (EXP.)	MEDIUM PERCENTAGE (%)
β -caryophyllene	1408	1411	34,75
Trans- α -bergamotene	1432	1431	16,32
Germacrene D 1480 1471 14,12	1408	1471	14,12
Copal acid	-	-	6,46
α -humulene	1452	1443	5,03
Acetoxy-copalic acid	-	-	3,19
Cis- γ -bisabolene	1514	1509	0,62
Others	-	-	15,94
Sesquiterpenes			85,55 %
Diterpenes			10,88 %
Identified Constituents			96,44 %

Source: UFAM Report (2021)

Tabela 2. Composição química estimada da formulação Hidrogel polimérico 10% óleo de *Copaifera multijuga*.

COMPONENT	MEDIUM PERCENTAGE (%)
β -cariofilene	3,60
Trans- α -bergamotene	1,69
Germacrene D 1480 1471 14,12	1,46
Copal acid	0,67
α -humulene	0,52
Acetoxy-copalic acid	0,33
Cis- γ -bisabolene	0,06
Outros	1,65
Sesquiterpenes	8,87 %
Diterpenes	1,13%
<i>Copaifera multijuga oil</i>	10%

Source: Author (2022)

APÊNDICE B- REVISÃO DA LITERATURA

Tabela 3. Revisão da Literatura sobre a toxicidade do óleo de Copaiba.

Palavra chave	Artigo positivo	Artigo negativo
(Copaifera) or (copaiba oil) and (genotoxicity)	<p>1)Cavalcanti BC. Genotoxicity evaluation of kaurenoic acid, a bioactive diterpenoid present in Copaiba oil. <i>Food Chem Toxicol.</i> 2006 Mar;44(3):388-92. doi: 10.1016/j.fct.2005.08.011. Epub 2005 Sep 21. PMID: 16182426. (21/10/22)</p> <p>2)Cardoso, P. C. dos S., Rocha, C. A. M. da, Leal, M. F., Bahia, M. de O., Alcântara, D. D. F. Á., Santos, R. A. dos, ... Burbano, R. M. R. (2017). Effect of diterpenoid kaurenoic acid on genotoxicity and cell cycle progression in gastric cancer cell lines. <i>Biomedicine & Pharmacotherapy</i>, 89, 772–780. doi:10.1016/j.biopha.2017.02.085</p> <p>3)Alves JM, Senedese JM, Leandro LF, Castro PT, Pereira DE, Carneiro LJ, Ambrósio SR, Bastos JK, Tavares DC. Copaifera multijuga oleoresin and its constituent diterpene (-)-copalic acid: Genotoxicity and chemoprevention study. <i>Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen.</i> 2017 Jul;819:26-30. doi: 10.1016/j.mrgentox.2017.05.001. Epub 2017 May 3. PMID: 28622827.</p>	<p>1)Dalenogare DP, Ferro PR, De Prá SDT, Rigo FK, de David Antoniazzi CT, de Almeida AS, Damiani AP, Strapazzon G, de Oliveira Sardinha TT, Galvani NC, Boligon AA, de Andrade VM, da Silva Brum E, Oliveira SM, Trevisan G. Antinociceptive activity of <i>Copaifera officinalis</i> Jacq. L oil and kaurenoic acid in mice. <i>Inflammopharmacology.</i> 2019 Aug;27(4):829-844. doi: 10.1007/s10787-019-00588-3. Epub 2019 May 16. PMID: 31098702. 2)Alves JM, Leandro LF, Senedese JM, Castro PT, Pereira DE, Resende FA, Campos DL, Silva JJM, Varanda EA, Bastos JK, Ambrósio SR, Tavares DC (2018) Antigenotoxicity properties of <i>Copaifera multijuga</i> oleoresin and its chemical marker, the diterpene (-)-copalic acid. <i>J Toxicol Environ Health A</i> 81:116–129. https://doi.org/10.1080/15287394.2017.1420505 3) Damasceno JL, Arnet YF, Fortunato GC, Giroto L, Marena GD, Rocha BP, Resende FA, Ambrosio SR, Veneziani RCS, Bastos JK, Martins CHG. Investigation of Safety Profile of Four <i>Copaifera</i> Species and of Kaurenoic Acid by Salmonella/Microsome Test. <i>Evid Based Complement Alternat Med.</i> 2019 Jan 10;2019:7631531. doi: 10.1155/2019/7631531. PMID: 30733813; PMCID: PMC6348810. 4)Furtado, R. A., de Oliveira, P. F., Senedese, J. M., Ozelin, S. D., de Souza, L. D. R., Leandro, L. F., ... Tavares, D. C. (2018). Assessment of genotoxic activity of oleoresins and leaves extracts of six <i>Copaifera</i> species for prediction of potential human risks. <i>Journal of Ethnopharmacology</i>, 221, 119–125. doi:10.1016/j.jep.2018.04.002</p>
(copaifera) and (genotoxicity) and (apoptosis)	<p>1) Urasaki Y, Beaumont C, Workman M, Talbot JN, Hill DK, Le TT. Fast-Acting and Receptor-Mediated Regulation of Neuronal Signaling Pathways by Copaiba Essential Oil. <i>Int J Mol Sci.</i> 2020 Mar 25;21(7):2259. doi: 10.3390/ijms21072259. PMID: 32218156; PMCID: PMC7177672. 2)Urasaki Y, Beaumont C, Talbot JN, Hill DK, Le TT. Akt3 Regulates the Tissue-Specific Response to Copaiba Essential Oil. <i>Int J Mol Sci.</i> 2020</p>	

	Apr 19;21(8):2851. doi: 10.3390/ijms21082851. PMID: 32325885; PMCID: PMC7216139.	
Copaifera and mutagenicity		<p>1) Leandro, LF. Assessment of the antibacterial, cytotoxic and mutagenic potential of the phenolic-rich hydroalcoholic extract from <i>Copaifera trapezifolia</i> Hayne leaves. 37 <i>Journal of Medical Microbiology</i> (2016), 65, 937. 950 DOI 10.1099/jmm.0.00. (21/10/22)</p> <p>2) Fernández YA, Damasceno JL, Abrão F, Silva TS, Cândido ALP, Fregonezi NF, Resende FA, Ramos SB, Ambrosio SR, Veneziani RCS, Bastos JK, Martins CHG. Antibacterial, Preservative, and Mutagenic Potential of <i>Copaifera</i> spp. Oleoresins Against Causative Agents of Foodborne Diseases. <i>Foodborne Pathog Dis.</i> 2018 Sep 19. doi: 10.1089/fpd.2018.2478. Epub ahead of print. PMID: 30230926.</p> <p>3) Damasceno JL, Arnet YF, Fortunato GC, Girotto L, Marena GD, Rocha BP, Resende FA, Ambrosio SR, Veneziani RCS, Bastos JK, Martins CHG. Investigation of Safety Profile of Four <i>Copaifera</i> Species and of Kaurenoic Acid by Salmonella/Microsome Test. <i>Evid Based Complement Alternat Med.</i> 2019 Jan 10;2019:7631531. doi: 10.1155/2019/7631531. PMID: 30733813; PMCID: PMC6348810.</p>
Copaifera and metabolization or liver metabolization	<p>1) Mauro, Mariana et al. In vitro metabolism of copalic and kaurenoic acids in rat and human liver microsomes. <i>Química Nova</i> [online]. 2021, v. 44, n. 6 [Accessed 24 October 2022], pp. 700-708. Available from: <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170724>. Epub 11 Aug 2021. ISSN 1678-7064. https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170724.</p>	
Copaifera and toxicity	<p>1) Leandro, LF. Assessment of the antibacterial, cytotoxic and mutagenic potential of the phenolic-rich hydroalcoholic extract from <i>Copaifera trapezifolia</i> Hayne leaves. 37 <i>Journal of Medical Microbiology</i> (2016), 65, 937. 950 DOI 10.1099/jmm.0.00. (21/10/22)</p> <p>2) Lima SR, Junior VF, Christo HB, Pinto AC, Fernandes PD. In vivo and in vitro studies on the anticancer activity of <i>Copaifera multijuga</i> hayne and its fractions. <i>Phytother Res.</i> 2003 Nov;17(9):1048-53. doi: 10.1002/ptr.1295. PMID: 14595585.</p> <p>3) Cardoso PCDS, Rocha CAMD, Leal MF,</p>	

	Bahia MO, Alcântara DDFÁ, Santos RAD, Gonçalves NDS, Ambrósio SR, Cavalcanti BC, Moreira-Nunes CA, Pessoa CDÓ, Burbano RMR. Effect of diterpenoid kaurenoic acid on genotoxicity and cell cycle progression in gastric cancer cell lines. <i>Biomed Pharmacother.</i> 2017 May;89:772-780. doi: 10.1016/j.biopha.2017.02.085. Epub 2017 Mar 6. PMID: 28273639.	
(kaurenoic acid) and (genotoxicity)	1)Cano, B. L., Moreira, M. R., Goulart, M. O., Dos Santos Gonçalves, N., Veneziani, R. C., Bastos, J. K., Ambrósio, S. R., & Dos Santos, R. A. (2017). Comparative study of the cytotoxicity and genotoxicity of kaurenoic acid and its semi-synthetic derivatives methoxy kaurenoic acid and kaurenol in CHO-K1 cells. <i>Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association</i> , 102, 102–108. https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.02.003 2) Plínio Cerqueira dos Santos Cardoso, Carlos Alberto Machado da Rocha, Mariana Ferreira Leal, Marcelo de Oliveira Bahia, Diego Di Felipe Ávila Alcântara, Raquel Alves dos Santos, Natália dos Santos Gonçalves, Sérgio Ricardo Ambrósio, Bruno Coêlho Cavalcanti, Caroline Aquino Moreira-Nunes, Claudia do Ó Pessoa, Rommel Mário Rodríguez Burbano, Effect of diterpenoid kaurenoic acid on genotoxicity and cell cycle progression in gastric cancer cell lines, <i>Biomedicine & Pharmacotherapy</i> , Volume 89, 2017, Pages 772-780, ISSN 0753-3322, https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.02.085 . https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0753332216324180	
(kaurenoic acid) and (metabolization)	1)Matos, D. M., Viana, M. R., Alvim, M., Carvalho, L., Leite, L., Da Silva Filho, A. A., & Nascimento, J. (2018). Pharmacokinetic profile and oral bioavailability of Kaurenoic acid from <i>Copaifera</i> spp. in rats. <i>Fitoterapia</i> , 128, 142–147. https://doi.org/10.1016/j.fitote.2018.05.013	
(Copaifera) or (copaiba oil) and toxicity and genotoxicity and mutagenicity	1) CAVALCANTI, B. C. Avaliação do potencial genotóxico e mutagênico do ácido caurenóico, um diterpeno isolado da planta <i>Copaifera Langsdorffii</i> Desf. (Leguminosae). 2006. 95 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006. 2)Cavalcanti, B. C., Costa-lotufo, L. V., Moraes, M. O., Burbano, R. R.,	1) Pavan E, Damazo AS, Lemos LMS, Adzu B, Balogun SO, Arunachalam K, Martins DTO. Evaluation of genotoxicity and subchronic toxicity of the standardized leaves infusion extract of <i>Copaifera malmei</i> Harms in experimental models. <i>J Etrnopharmacol.</i> 2018 Jan 30; 211;70-77. doi: 10.1016/j.jep.2017.09.027. Epub 2017 Sep 21.

<p>Silveira, E. R., Cunha, K. M. A., ... Pessoa, C. (2006). Genotoxicity evaluation of kaurenoic acid, a bioactive diterpenoid present in Copaiba oil. <i>Food and Chemical Toxicology</i>, 44(3), 388–392. doi:10.1016/j.fct.2005.08.011 10.1016/j.fct.2005.08.011</p>	<p>PMID:28943446</p>
---	----------------------

APÊNDICE C- TABELAS

Tabela 4. Resultados teste de citotoxicidade das célula V79-4

V79-4 cell							
Sample	Concentration (µg/mL)	% Tox					
		Without S9			With S9		
		RICC (%)	RPD(%)	IS(%)	RICC (%)	RPD(%)	IS(%)
Oleoresin from <i>Copaifera multijuga</i> (10%)	0	100 ± 0.9	100 ± 0.9	100 ± 0.9	105.2 ± 3,0	102.6 ± 3,0	100,0 ± 3,0
	0,52	NA	NA	NA	103,0 ± 1,2	101,6 ± 1,2	102,5 ± 1,2
	1,03	NA	NA	NA	102,0 ± 2,0	101,0 ± 2,0	101,6 ± 2,0
	2,06	110.2±2.6	104.5±2.6	108.5 ±2.6	75.26 ± 4,0	85.9 ± 4,0	80.7 ± 4,0
	4.13	102.8±7.7	101.3 ±7.7	102.4±7.7	61.7 ± 3,4	76.6 ± 3,4	70.1 ± 3,4
	8.25	102.2 ±0.5	101.0 ±0.5	101.8 ± 0.5	18,7 ± 3,2	33,7 ± 3,2	36,6 ± 3,2
	16.5	96.4±6.9	98.3 ±6.9	97.0±6.9	7,7 ± 2,9	15,9 ± 2,9	27,9 ± 2,9
	19.8	112.9±3.4	107.9±3.4	108.1±3.4	NA	NA	NA
	23.1	51.6±1.9	63.4±1.9	69.6±1.9	NA	NA	NA
	26.4	35.1±1.9	46.9±1.9	59.3±1.9	NA	NA	NA
	29.7	13.9±5.5	21.3±5.5	46.1±5.5	NA	NA	NA
	33.0	23.9± 1.7	44.0 ± 1.7	36.4± 1.7	2,9 ± 2,3	6,5 ± 2,3	24,2 ± 2,3
	EMS (350µg/mL) or CPA (3,2µg/mL)	48.5 ± 1.7	68.8 ± 1.7	57.0± 1.7	57.7 ± 3,5	73.5 ± 3,5	66.9 ± 3,5
	Hydrogel containing oleoresin from <i>Copaifera multijuga</i> (10%)	0	100.0 ± 1.2	100.0 ± 1.2	100.0 ± 1.2	100±1.1	100±1.1
0.26		104.4±5.9	102.3±5.9	103.4±5.9	118.3±2.3	110.7±2.3	112.8±2.3
0,52		100.6 ±3.6	100.7 ±3.6	100.0±3.6	101.2±2.3	100.6±2.3	100.9±2.3
1,03		104.4±1.2	102.3±1.2	103.4±1.2	97.6±1.2	98.6±1.2	98.3±1.2
2,06		102.2±5.9	101.2±5.9	101.7±5.9	73.2±8.5	82.7±8.5	81.3±8.5
4.13		92.4±7.0	95.8±7.0	98.2±7.0	63.4±1.2	75.3±1.2	74.4±1.2
8.25		105.5±4.7	102.9±4.7	104.2±4.7	43.8±6.1	58.4±6.1	60.7±6.1
16.5		98.9±2.4	99.4±2.4	99.2±2.4	31.58±1.2	45.8±1.2	52.2±1.2
33.0		25.9±3.6	41.9±3.6	43.8±3.6	16.4±3.1	26.8±3.1	41.6±3.1
EMS (350µg/mL) or CPA (3,2µg/mL)		32.5± 1.2	49.6± 1.2	48.8± 1.2	40.1±4.9	54.7±5.9	58.1±4.9
Control phytotherapeutic formulation (only excipients)	0	100.0 ± 1.2	100.0 ± 1.2	100.0 ± 1.2	100±1.1	100±1.1	100±1.1

	0,26	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	0,52	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	1,03	100.1±5.8	100.1±5.8	100.1±5.8	97.6±3.6	98.5±3.6	98.3±3.6
	2,06	99.2±1.2	94.8±1.2	98.7±1.2	87.7±3.7	92.5±3.7	91.4±3.7
	4.13	107.7±2.4	104.0±2.4	105.8±2.4	81.63±7.2	88.6±7.2	87.2±7.2
	8.25	103.0±4.4	101.6±4.4	102.3±4.4	79.6±2.4	87.0±2.4	85.7±2.4
	16.5	112.0 ±9.4	106.2±9.4	109.1±9.4	90.1±0.4	94±0.4	89.1±0.4
	33.0	103.3±4.7	101.7 ±4.7	102.5±4.7	97.3±6.0	92.6±6.0	91.5±6.0
	EMS (350µg/mL) or CPA (3,2µg/mL)	32.5± 1.2	49.6± 1.2	48.8± 1.2	40.1±4.9	54.7±5.9	58.1±4.9

Tabela 5. Resultados teste de citotoxicidade das célula HepG2

HepG2 cell				
Sample	Concentration (µg/mL)	% Tox		
		RICC (%)	RPD(%)	IS(%)
Oleoresin from <i>Copaifera multijuga</i> (10%)	0	100 ±3.0	100 ± 3.0	100 ± 3.0
	0,52	102.7±0.7	104.8±0.7	103.3±0.7
	1,03	108.6±10.8	104.9±10.8	105.9±10.8
	2,06	94.7±2.7	96.8±2.7	96.3±2.7
	4.13	70.1±5.4	80.3±5.4	79.4±5.4
	8.25	61.8±7.1	73.8±7.1	73.7±7.1
	16.5	53.7±5.2	67.1±5.2	68.2±5.2
	33.0	34.5± 8.1	48.6± 8.1	54.9± 8.1
	EMS (350µg/mL)	36.9 ± 8.1	51.2± 8.1	56.6± 8.1
Hydrogel containing oleoresin from <i>Copaifera multijuga</i> (10%)	0	100 ±3.0	100 ± 3.0	100 ± 3.0
	0.26	100.3±8.1	100.2±8.1	100.2±8.1
	0,52	97.5±3.7	98.5±3.7	98.3±3.7
	1,03	84.3±2.5	90.2±2.5	89.2±2.5
	2,06	72.9±2.7	82.3±2.7	81.4±2.7
	4.13	64.6±10.8	76.3±10.8	75.6±10.8
	8.25	50.9±2.5	64.6±2.5	66.2±2.5
	16.5	42.8±5.4	57.1±5.4	60.6±5.4
	33.0	23.3±2.7	35.7±2.7	47.2 ±2.7
	EMS (350µg/mL)	36.9 ± 8.1	51.2± 8.1	56.6± 8.1
Control phytotherapeutic formulation (only excipients)	0	100.0 ± 3.0	100.0 ± 3.0	100.0 ± 3.0
	0.26	NA	NA	NA
	0,52	NA	NA	NA
	1,03	97.5±0.9	98.9±0.9	98.3±0.9
	2,06	103.8±5.4	102.2±5.4	102.6±5.4
	4.13	97.7±10.6	98.7±10.6	98.4± 10.6
	8.25	NA	NA	NA

	16.5	<i>NA</i>	<i>NA</i>	<i>NA</i>
	33.0	106.8±10.3	103.9±10.3	104.7±10.3
	EMS (350µg/mL)	36.9 ± 8.1	51.2± 8.1	56.6± 8.1

Tabela 6. Resultados teste de micronúcleo *in vitro*- célula V79-4-S9

V79-4 cell without S9																	
Sample	Concentration (µg/mL)	Microscopic slide	Colonies with N cells				N° total number of colonies	N° of computed cells	N° of cells with micronucleus	% micronucleus cells	N° of micronucleated cells / 2000 cells counted per concentration	MI (%)	PI (%)	X2 teste, p < 0,05	Is there a significant difference in the frequency of micronucleus cells when compared to the control (CN)?	According to the test, is the sample positive or negative for genotoxicity?	
			1	2	3 -- 4	5 -- 8											
Oleoresin from <i>Copaifera multijuga</i> (10%)	NC	1	98	53	71	83	305	1009	4	0,4	10,0	2,5	2,5				
		2	26	24	87	90	227	1001	6	0,6		2,1	3,1				
	23.1	1	37	88	111	49	285	1000	8	0,8	13	2,5	2,6	0,6822	no	negative	
		2	65	55	111	64	295	1041	5	0,5		3,1	2,6				
	16.5	1	37	88	111	49	285	1000	8	0,8	13	2,5	2,6	0,5354	no	negative	
		2	65	55	111	64	295	1041	5	0,5		3,1	2,6				
	8.25	1	47	61	98	71	277	1002	4	0,4	11,0	3,3	2,5	0,8268	no	negative	
		2	50	28	107	72	257	1016	7	0,7		3,3	2,8				
	4.13	1	33	33	74	89	229	1005	4	0,4	11	2,3	3,0	0,8268	no	negative	
		2	54	62	101	68	285	1022	7	0,7		4,3	2,6				
	EMS (350µg/mL)	1	57	110	100	52	319	1002	50	5,0	105,0	4,4	2,5	<0,0001	yes	positive	
		2	67	85	143	37	332	1009	45	4,5		2,5	2,5				
	Hydrogel containing oleoresin from <i>Copaifera multijuga</i> (10%)	1,03	1	62	68	106	54	290	1004	6	0,6	9	2,5	4,3	0,8114	no	negative
			2	34	54	115	51	254	1006	3	0,3		2,7	3,1			
0.52		1	62	68	126	54	310	1005	4	0,4	10,0	2,6	2,8	>0,9999	no	negative	
		2	69	33	76	84	262	1000	5	0,5		2,7	3,4				
0.26		1	33	47	124	56	260	1011	8	0,8	17	2,8	3,2	0,1765	no	negative	
		2	51	33	70	81	235	1003	9	0,9		2,8	3,1				
Control phytotherapeutic formulation (only excipients)	1,03	1	47	43	87	74	251	1003	3	0,3	11,0	2,7	4,0	0,8268	no	negative	
		2	35	63	112	64	274	1054	8	0,8		2,7	2,8				

Tabela 7 Resultados teste de micronúcleo *in vitro*- célula V79-4+S9

V79-4 cell with S9																	
Sample	Concentration (µg/mL)	Microscopic slide	Colonies with N cells				N° total number of colonies	N° of computed cells	N° of cells with micronucleus	% micronucleus cells	N°of micronucleated cells / 2000 cells counted per concentration	MI (%)	PI (%)	X2 teste.p < 0,05	Is there a significant difference in the frequency of micronucleus cells when compared to the control (CN)?	According to the test, is the sample positive or negative for genotoxicity?	
			1	2	3 -- 4	5 -- 8											
Oleoresin from <i>Copaifera multijuga</i> (10%)	NC	1	40	85	135	42	302	1007	14	1,4	31,0	2,5	2,6				
		2	53	61	137	55	306	1036	18	1,7		2,1	2,6				
	4.13	1	115	62	115	51	343	1015	24	2,4	47,0	3,8	2,3	0,1198	no	negative	
		2	76	71	107	59	313	1001	23	2,3		3,0	2,5				
	2.6	1	54	81	148	37	320	1004	22	2,2	44	3,2	2,5	0,1297	no	negative	
		2	54	84	119	48	305	1024	23	2,2		3,0	2,5				
	1,03	1	84	69	104	55	312	1004	18	1,8	35	2,5	2,4	0,6196	no	negative	
		2	23	84	120	61	288	1008	17	1,7		3,0	2,8				
	0.52	1	80	72	147	46	345	1022	11	1,1	23	2,2	2,5	0,273	no	negative	
		2	38	85	120	47	290	1000	12	1,2		2,8	2,6				
	CPA (32 µg/mL)	1	35	80	120	52	287	1001	52	5,2	105	3,0	2,7	<0,0001	yes	positive	
		2	80	108	130	35	353	1008	53	5,3		3,6	2,3				
	Hydrogel containing oleoresin from <i>Copaifera multijuga</i> (10%)	1,03	1	40	35	107	87	269	1049	10	1,0	21	2,9	2,8	0,2347	no	negative
			2	64	53	142	42	301	1000	11	1,1		2,5	3,4			
0.52		1	48	62	133	49	292	1017	13	1,3	20	2,6	4,3	0,3014	no	negative	
		2	59	47	97	84	287	1007	7	0,7		2,7	3,7				
0.26		1	49	62	133	55	299	1001	8	0,8	18	2,6	4,3	0,4777	no	negative	
		2	51	33	70	81	235	1003	9	0,9		2,8	3,1				
Control phytotherapeutic formulation (only excipients)	1,03	1	61	79	139	43	322	1003	13	1,3	26	2,1	2,5	0,4927	no	negative	
		2	44	83	134	46	307	1007	13	1,3		3,2	2,6				

Tabela 8. Resultados teste de micronúcleo *in vitro*- célula HepG2

HepG2																	
Sample	Concentration(μ g/mL)	Microscopic slide	Colonies with N cells				N° total number of colonies	N° of computed cells	N° of cells with micronucleus	% micronucleus cells	N°of micronucleated cells / 2000 cells counted per concentration	MI (%)	PI (%)	X2 teste,p < 0,05	Is there a significant difference in the frequency of micronucleus cells when compared to the control (CN)?	According to the test, is the sample positive or negative for genotoxicity?	
			1	2	3 -- 4	5 -- 8											
Oleoresin from <i>Copaifera multijuga</i> (10%)	NC	1	56	158	112	40	366	1009	33	3,3	66,0	2,5	2,4				
		2	93	102	105	43	343	1015	34	3,3		3,2	2,3				
	8.25	1	36	137	114	49	336	1000	73	7,3	149	3,1	2,5	<0,0001	yes	positive	
		2	80	110	107	41	338	1001	76	7,6		2,4	2,3				
	2,06	1	24	91	153	32	300	1000	50	5,0	96,0	3,5	2,4	0,0132	yes	positive	
		2	79	172	110	27	388	1066	50	4,7		3,0	2,2				
	1,03	1	35	115	130	31	311	1001	32	3,2	58	2,9	2,5	0,5247	no	negative	
		2	34	103	106	51	294	1012	27	2,7		2,7	2,6				
	EMS (350 μ g/mL)	1	61	125	146	19	351	1002	79	7,9	162,0	2,4	2,4	<0,0001	yes	positive	
		2	62	108	122	37	329	1005	84	8,4		2,9	2,4				
	Hydrogel containing oleoresin from <i>Copaifera multijuga</i> (10%)	1,03	1	31	118	126	40	315	1025	35	3,4	69	2,3	2,6	0,7928	no	negative
			2	102	168	95	30	395	1006	36	3,6		2,3	2,1			
0.52		1	62	190	106	28	386	1012	32	3,2	62,0	2,0	2,3	0,7193	no	negative	
		2	25	112	153	46	336	1146	35	3,1		2,1	2,7				
0.26		1	50	209	114	40	413	1156	34	2,9	59	2,7	2,3	0,5247	no	negative	
		2	13	154	111	39	317	1000	30	3,0		2,8	2,6				
Control phytotherapeutic formulation (only excipients)	1,03	1	14	143	130	29	316	1002	32	3,2	58,0	2,4	2,6	0,4655	no	negative	
		2	71	137	124	22	354	1022	27	2,6		2,3	2,3				

