



FABIO VIEIRA DOS SANTOS

AVALIAÇÃO DA MUTAGENICIDADE *IN VIVO* E *IN VITRO* DE COMPOSTOS OBTIDOS DE PLANTAS NATIVAS DO CERRADO

Araraquara
2006



FABIO VIEIRA DOS SANTOS

AVALIAÇÃO DA MUTAGENICIDADE *IN VIVO* E *IN VITRO* DE COMPOSTOS OBTIDOS DE PLANTAS NATIVAS DO CERRADO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor.

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Eliana Aparecida Varanda

Araraquara
2006

Banca Examinadora

Profa. Dra. Eliana Aparecida Varanda

Profa. Dra. Daisy Maria Fávero Salvadori

Profa. Dra. Francisca da Luz Dias

Profa. Dra. Denise Crispim Tavares

Profa. Dra. Iracilda Zeppone Carlos

À minha eterna companheira

Vanessa

AGRADECIMENTOS

Agradeço, acima de tudo, **a Deus**, que me deu saúde, inteligência e perseverança para concluir mais essa etapa de minha vida.

À minha esposa, **Vanessa**, que me apoiou em cada momento, agüentando minha ausência, me tolerando quando só falava “de tese”, me dando idéias e, principalmente, estando sempre do meu lado e torcendo por mim. Te Amo!

Aos meus pais, **Antonio e Gracinda**, a quem sempre serei grato por ter chegado até aqui. Nunca poderei retribuir à altura.

À Prof^ª Dr^ª **Eliana Aparecida Varanda**, que nesses anos passou de orientadora a amiga, pelos ensinamentos, pela paciência e por sempre estar disposta a ouvir e eliminar as dúvidas de seus alunos.

À Prof^ª Dr^ª **Ilce Mara S. Cólus**, por permitir a utilização de seu laboratório e por continuar sendo uma grande amiga, que conquistei no início de minha formação acadêmica e espero carregar pelo resto da vida.

Ao amigo **Walclécio Lira** pela ajuda com os experimentos, pelas divertidas conversas no laboratório, pelas risadas, pela parceria nos congressos. Conte sempre comigo.

À amiga **Soraya Varella**, que me “apresentou” o Teste de Ames e tantas outras coisas no laboratório e sempre esteve disposta a ajudar no que fosse preciso, sem esperar nada em troca.

À **Silvia**, técnica do laboratório, pela ajuda, pelos ensinamentos e pelas conversas agradáveis. Pena que os tampões dos meus Erlenmeyers nunca ficaram tão bons quanto os seus.

Aos demais amigos do laboratório de Mutagênese da FCFAR: **Ana Paula, Cássia, Fabiana, Raquel e Tuga**.

Aos meus amigos de sempre: **Geraldo, Fabinho, Priscilla Negraes, Eduardo Mota, Fabiana, Joelson, Simone, Catarina, Caroline e Thiago Japonês**. Valeu pela torcida e por nunca se afastarem desse amigo tão ausente.

Aos meus irmãos **Marco e Rose** e aos meus cunhados **Gisele e Odair** também por sempre se preocuparem e torcerem pelo meu sucesso, bem como à minha afilhada **Beatriz**.

À todos aqueles que de alguma forma colaboraram com a concretização desse trabalho e cujos nomes não foram citados aqui. Nunca me esquecerei de vocês.

Muito Obrigado!!!

RESUMO

O uso de plantas medicinais é uma prática bastante comum em nosso país, bem como em várias outras regiões do planeta. Porém, muitas plantas apresentam em sua constituição química compostos que podem representar sérios riscos à saúde humana. Assim, se faz necessária a realização de ensaios que visem a caracterização fitoquímica e dos efeitos biológicos que os produtos derivados de espécies vegetais, tidas como medicinais, podem apresentar. No presente trabalho, foram avaliadas dez espécies vegetais, nativas do cerrado brasileiro e utilizadas popularmente no tratamento de úlceras gástricas, quanto ao seu potencial mutagênico. Foram empregados os testes de Ames (*in vitro*) e do micronúcleo em células do sangue periférico de camundongos (*in vivo*). De cada espécie vegetal foram avaliados dois tipos de extratos brutos: um polar e um apolar. Nos ensaios *in vitro* foi verificada mutagenicidade especialmente para os extratos polares (metanólicos) das seguintes espécies vegetais: *A. castaneifolia*, *A. glandulosa*, *A. triplinervia*, *M. pusa*, *Q. grandiflora*, *Q. multiflora* e *S. pseudoquina*. Nesses mesmos ensaios, os únicos extratos apolares que apresentaram mutagenicidade foram os obtidos de *Q. grandiflora* e *Q. multiflora*. Foram avaliados *in vivo* apenas os extratos polares, sendo que apresentaram mutagenicidade os extratos metanólicos de *A. castaneifolia*, *A. glandulosa*, *A. triplinervia*, *Q. multiflora* e *S. pseudoquina*. De acordo com as caracterizações químicas realizadas com as espécies vegetais estudadas, ficou evidente a participação bastante efetiva dos compostos fenólicos

(flavonóides e taninos) na mutagenicidade observada. Também foi possível verificar o papel que possíveis interações entre os diferentes compostos químicos presentes nos extratos podem ter em suas atividades biológicas. Tendo em vista as informações obtidas, ficou clara a necessidade que os estudos biológicos e fitoquímicos apresentam para se promover uma maior compreensão dos riscos que podem estar associados aos tratamentos medicinais baseados em plantas.

ABSTRACT

The use of medicinal plants is a common practice in our country as well as in several other regions of the planet. However, many plants represent in its chemical constitution compounds that represent serious risks to the human health. Thus, it is necessary the accomplishment of assays that permit the characterization of the phytochemical properties and of the biological effects that the vegetal products obtained from medicinal plants can present. In this work we evaluate the mutagenic potential of ten vegetable species native of the Brazilian savannah and used popularly in the treatment of gastric ulcers. The Ames test (*in vitro*) and the Micronucleus test (*in vivo*) were employed. We evaluate a polar extract and a non-polar extract to each vegetal species. The *in vitro* assays show the mutagenicity of the methanol extracts (polar) obtained from *A. castaneifolia*, *A. glandulosa*, *A. triplinervia*, *M. pusa*, *Q. grandiflora*, *Q. multiflora* e *S. pseudoquina*. The non-polar extracts from *Q. grandiflora* e *Q. multiflora* were mutagenic too. *In vivo*, only the polar extracts were studied and the methanol extracts from *A. castaneifolia*, *A. glandulosa*, *A. triplinervia*, *Q. multiflora* e *S. pseudoquina* were mutagenic. The phytochemical studies with the evaluated plants permit to infer the participation of the flavonoids and tannins in the mutagenic activities observed *in vitro* and *in vivo*. We also verified in this biological activity possible interactions between the different substances present in the raw extracts. In this way, we could to observe the importance of phytochemical and biological studies to promote a better comprehension of the risks that can be associated to the medicinal treatments based in the plants use.

Lista de Abreviaturas

+S9.....	Com Ativação Metabólica
-S9.....	Sem Ativação Metabólica
AMG.....	Agar Mínimo Glisoso
ANOVA.....	Análise de Variância
AO.....	Acridine Orange
CHCl ₃	Clorofórmico
Ctrol -.....	Controle Negativo
Ctrol +.....	Controle Positivo
DCM.....	Diclorometânico
DNA.....	Ácido Desoxirribonucléico
FEA.....	Fração Enriquecida de Alcalóides
FEF.....	Fração Enriquecida de Flavonóides
FET.....	Fração Enriquecida de Taninos
MeOH.....	Metanólico
MN.....	Micronúcleo
MNRET.....	Reticulócito Micronucleado
MTC.....	Medicina Tradicional Chinesa
p.c.....	Peso Corpóreo
RM.....	Razão de Mutagenicidade
RNA.....	Ácido Ribonucléico
UV.....	Ultra-Violeta

SUMÁRIO

Capítulo 1

1. Introdução	1
1.1 O Cerrado	1
1.2 O uso de Plantas Medicinais	6
1.3 Algumas Espécies Medicinais do Cerrado	12
1.3.1 Espécies do Gênero <i>Alchornea</i>	12
1.3.2 <i>Anacardium humile</i> St. Hil.	16
1.3.3 <i>Byrsonima basiloba</i> A. Juss.	18
1.3.4 <i>Mouriri pusa</i> Gardner	19
1.3.5 Gênero <i>Qualea</i>	20
1.3.6 <i>Strychnos pseudoquina</i> St. Hil.	23
1.4 Princípios de Mutagênese	25
1.5 Sistemas-teste para Avaliação de Mutagenicidade/Antimutagenicidade	27
1.5.1 Teste de Ames (<i>Salmonella</i> /Microsome Assay)	27
1.5.2 Teste do Micronúcleo	29
2. Objetivos	33
3. Material e Métodos.....	34
3.1 Espécies Vegetais Estudadas.....	34
3.2 Preparo dos Extratos Vegetais	36
3.3 Obtenção das Frações Enriquecidas e Substâncias Puras	39

3.3.1 Frações Enriquecidas de Flavonóides e Taninos de <i>M. pusa</i>	39
3.3.2 Frações Enriquecidas de Flavonóides e Alcalóides de <i>S. pseudoquina</i>	41
3.4 Doses Utilizadas	41
3.5 Animais	42
3.6 Teste de Ames	43
3.6.1 Linhagens Utilizadas	43
3.6.2 Manutenção e Estoque das Cepas de <i>S. typhimurium</i>	44
3.6.3 Verificação das Características Genéticas das Cepas de <i>S. typhimurium</i>	44
3.6.4 Preparo dos Inóculos de <i>S. typhimurium</i> Utilizados no Ensaio	44
3.6.5 Meios de Cultura	45
3.6.6 Preparo da Mistura de S9	45
3.6.7 Controles	46
3.6.8 Ensaio de Mutagenicidade	46
3.7 Teste do Micronúcleo	47
3.7.1 Preparo das lâminas com Acridine Orange	47
3.7.2 Obtenção do Sangue e Preparo das Células	48
3.7.3 Ensaio de Mutagenicidade	48
3.8 Análise Estatística dos Resultados	49
3.8.1 Teste de Ames	49
3.8.2 Teste do Micronúcleo	51
4. Resultados.....	52
4.1 Resultados <i>in vitro</i> – Extratos Polares, Apolares e Frações Enriquecidas	52

4.1.1 Gênero <i>Alchornea</i>	52
4.1.2 <i>Anacardium humile</i>	59
4.1.3 <i>Byrsonima basiloba</i>	62
4.1.4 <i>Mouriri pusa</i>	65
4.1.5 Gênero <i>Qualea</i>	70
4.1.6 <i>Strychnos pseudoquina</i>	78
4.1.7 Substâncias Isoladas	78
4.2 Resultados <i>in vivo</i> – Extratos Polares	81
5. Discussão.....	86
5.1 Gênero <i>Alchornea</i>	93
5.2 <i>Anacardium humile</i>	100
5.3 <i>Byrsonima basiloba</i>	101
5.4 <i>Mouriri pusa</i>	105
5.5 Gênero <i>Qualea</i>	111
5.6 <i>Strychnos pseudoquina</i>	114
5.7 Uma Visão Geral dos Resultados	114
6. Conclusões	118
 <i>Capítulo 2</i>	
1. Artigo publicado	120

Referências Bibliográficas	127
---	------------

1. INTRODUÇÃO

1.1 O Cerrado

O Brasil, com 8.511.965 Km² é o quinto maior território do planeta, abrangendo uma área distribuída desde aproximadamente 5°N até quase 34°S, e apresentando uma grande diversidade de clima, fisiografia, de solo, de vegetação e de fauna. Representando cerca de 20% dessa área, o domínio do Cerrado, contabilizando-se as áreas periféricas que se encontram encravadas em outros domínios e áreas de transição, abrange cerca de 2 milhões de Km² (COUTINHO, 2002). Esse domínio (Figura 1) se distribui pelos estados da Bahia, Goiás, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Piauí, Rondônia, São Paulo e Tocantins (GOMES et al., 2004).

De acordo com Coutinho (2002) o clima predominante no Cerrado é o tropical sazonal, de inverno seco, com temperaturas médias anuais em torno de 22-23°C, mas com oscilações sazonais onde as máximas podem chegar a 40°C e as mínimas a 0°C (fato mais raro, que ocorre ocasionalmente nas regiões mais austrais do domínio). A precipitação média anual varia entre 1200 e 1800 mm, com as chuvas se concentrando entre os meses de outubro a março, sendo essa a estação chuvosa. A estação da seca, entre maio e setembro, tem níveis pluviométricos muito reduzidos, podendo chegar a zero.

O relevo do domínio cerrado é, em geral, bastante plano ou com poucas ondulações, com altitudes entre 300 e 600 metros acima do nível do mar; apenas 5% de sua área estão acima de 900 metros de altitude (COUTINHO, 2002).

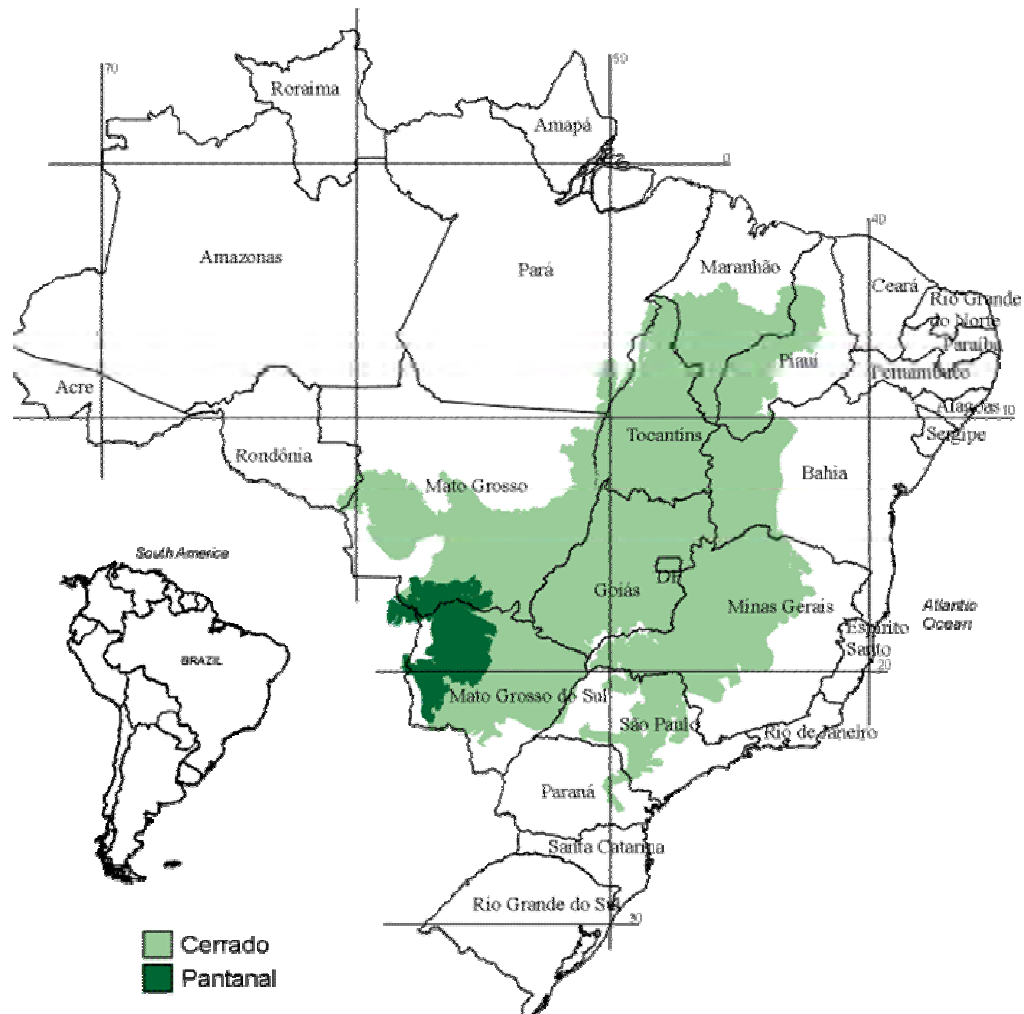


Figura 1. Área de abrangência do cerrado

O cerrado apresenta cerca de 2000 espécies arbustivas-arbóreas e cerca de 5000 espécies herbáceo-subarbustivas compondo sua flora (CASTRO et al., 1999 apud BORGES e SHEPHERD, 2005), sendo considerado um *Hotspot* de biodiversidade (MYERS et al., 2000), o que é definido como uma área que contém, como endêmicas, pelo menos 0,5% das 300 mil espécies vegetais conhecidas no planeta. Mas não é apenas em termos de biodiversidade vegetal que o Cerrado tem sua importância. Existem cerca de 120 espécies de répteis, 160 espécies de mamíferos, 800

espécies de aves e 150 espécies de anfíbios que são nativos desta região (Moffat, 2002).

De acordo com Coutinho (2002) o cerrado é composto por duas floras distintas, sendo uma puramente arbustiva-arbórea, predominante nas fisionomias florestais (cerradão), e outra herbáceo-subarbustiva, característica das fisionomias campestres (campo limpo). As fisionomias savânicas, ou seja, as formas intermediárias (campo cerrado e campo sujo) caracterizam-se pela ocorrência de uma flora mista, compostas por elementos florestais e campestres. Essas diferentes características na composição florística do cerrado são decorrentes da fertilidade do solo e do regime de queimadas que é observado em uma determinada área (Figura 2).



Figura 2. Diferentes fisionomias do cerrado

A vegetação arbórea é caracterizada por apresentar troncos tortuosos, súber espesso, macrofilia (folhas grandes) e esclerofilia (folhas rígidas, com textura áspera). Seu sistema subterrâneo é composto por raízes pivotantes que podem atingir mais de 15 metros de profundidade, buscando atingir, no período de seca, as zonas permanentemente úmidas do solo. A vegetação herbácea e subarborescente é composta também por espécies perenes que possuem órgãos subterrâneos de resistência à seca e ao fogo (bulbos e xilopódios, por exemplo). Suas raízes são superficiais e seus ramos aéreos são anuais, morrendo durante a estação seca, o que gera toneladas de palha por hectare. Essa palha é o combustível que favorece a ocorrência e alastramento das queimadas no cerrado (COUTINHO, 2002).

O fogo é um dos fatores mais determinantes das características do cerrado, tendo uma extraordinária importância e múltiplos efeitos para esse bioma. Um dos efeitos do fogo é a remineralização da biomassa, acelerando a passagem dos nutrientes, “presos” nas folhas secas e indisponíveis às plantas, para o solo, sob a forma de cinzas. Porém, grande parte dos nutrientes é perdida na forma de fumaça, que acaba sendo uma mistura de nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio, magnésio e enxofre. Mas esses nutrientes, felizmente, acabam retornando ao solo, seja por gravidade ou carregados por gotas de chuva (COUTINHO, 2002).

Ainda segundo Coutinho (2002), o fogo é responsável por alterações drásticas nas fisionomias do cerrado, uma vez que sucessivas queimadas podem transformar cerradões, ricos em espécies arbóreas, em campos sujos ou até mesmo em campos limpos, com quase ausência dessas espécies, que são mais sensíveis às queimadas que as espécies herbáceas. Além disso, as queimadas têm papel primordial

no processo de germinação de algumas sementes. Muitas das espécies de cerrado têm suas sementes impermeáveis à água, o que pode ser revertido pela elevação brusca na temperatura, que acaba gerando fissuras na casca dessas sementes, possibilitando a entrada de água e, conseqüentemente, a germinação.

Como podemos verificar, o cerrado não é apenas uma região de solo pobre e espécies vegetais de aspecto estranho que sofrem com a seca. Muito pelo contrário, esse domínio tem se mostrado de grande importância em termos de biodiversidade e com aspectos ecológicos muito peculiares. Porém, esse domínio vem sendo devastado rapidamente, sem que antes possamos ter o devido conhecimento de suas características ecológicas, botânicas ou fitoquímicas.

De acordo com uma reportagem publicada na Revista Nature no final de 2005 (MARRIS, 2005), nos últimos 35 anos mais de metade da extensão original do Cerrado foi substituída por plantações de soja e por pastos para a criação de gado de corte. Um relatório técnico do Conservação Internacional – Brasil (MACHADO et al. 2004), demonstra que os desmatamentos anuais das áreas de Cerrado chegam a 1,1 %, o que representa uma perda de 2,2 milhões de hectares ao ano. Se esse ritmo for mantido, ainda de acordo com esse relatório, que se baseou em dados obtidos por satélite, o Bioma Cerrado terá sido eliminado por volta do ano 2030.

Essa intensa destruição do Cerrado é resultado do aumento na frequência e na intensidade das atividades antrópicas, como a exploração madeireira, a pecuária, o uso indiscriminado do fogo e da expansão de culturas como a de cana-de-açúcar e de frutos cítricos (PEREIRA-SILVA et al., 2004).

O estado de São Paulo é um exemplo de como a destruição do Cerrado está se dando de forma acelerada. Originalmente o Cerrado cobria aproximadamente 14% desse estado. Em 1962 ainda estava presente em 13,7% da área de São Paulo, mas, na última década, sua área já havia sido diminuída a apenas 6,9% área original, distribuída em 8.353 fragmentos (KRONKA et al., 1998 apud PEREIRA-SILVA et al., 2004), sendo que apenas 10% desses fragmentos se encontram protegidos na forma de unidades de conservação (CAVASSAN, 2002).

Além da existência de poucas unidades de conservação visando a proteção do cerrado, essas unidades se encontram, na sua maioria, em total abandono. Em muitos casos, representam apenas áreas de vegetação protegidas por cercas, como se isso fosse capaz de mantê-las resguardadas. Além disso, espécies de gramíneas exóticas, trazidas especialmente da África para a formação de pastagens, vêm invadindo e substituindo as espécies nativas do riquíssimo estrato herbáceo-arbustivo do cerrado. Caso essa situação não se reverta, dentro de alguns anos, o cerrado, incluindo as chamadas unidades de conservação, será transformado em grandes pastos e terá perdido, permanentemente, toda sua riqueza de espécies de outrora (COUTINHO, 2002).

1.2 O uso de plantas medicinais

O uso de plantas medicinais é uma das mais antigas práticas realizadas pelo homem, sendo, ainda hoje, muito difundida em todo o planeta. De acordo com a Organização Mundial da Saúde, cerca de 80% da população mundial faz uso de tratamentos ou medicamentos sugeridos pela chamada medicina tradicional (CRAGG

et al., 1995 apud BASSO et al., 2005). Entretanto, no mundo ocidental industrializado criou-se uma resistência ao uso de medicamentos tradicionais, principalmente devido à crença na ineficácia desses elementos frente aos medicamentos alopáticos.

Na metade do século XX a farmacognosia (estudo das plantas que têm papel para a saúde humana) era uma ciência praticamente morta. Porém, durante a parte final do século XX, o “herbalismo” voltou a tomar força, provavelmente devido ao reconhecimento das farmacopéias tradicionais como importante fonte de tratamentos acessíveis e à idéia de que esses tratamentos seriam mais seguros e eficientes do que os baseados em medicamentos alopáticos (ELVIN-LEWIS, 2001).

Esse reconhecimento se deve especialmente ao fato das pessoas tomarem consciência de que grande parte dos medicamentos alopáticos hoje produzidos, e consumidos em larga escala, são de alguma forma baseados em produtos naturais, sendo, a maioria, derivados de espécies vegetais. Das 877 novas moléculas introduzidas no mercado farmacêutico entre 1981 e 2000 cerca de 50% eram produtos naturais, análogos semi-sintéticos de produtos naturais ou compostos sintéticos baseados em produtos naturais (NEWMAN et al., 2000). Hoje, aproximadamente 25% dos medicamentos prescritos mundialmente e 11% dos 252 medicamentos considerados essenciais pela Organização Mundial da Saúde são derivados exclusivamente de plantas (RATES, 2001).

Todas essas informações comprovam a importância que os estudos farmacológicos, utilizando plantas para a identificação de substâncias bioativas, têm para a saúde pública. Entretanto, esses estudos não podem ser realizados de maneira

randômica, pois demandariam muito tempo e as chances de sucesso seriam remotas, devido à infinidade de espécies vegetais e de compostos químicos existentes na natureza.

Uma abordagem de bioprospecção bastante interessante e que têm encontrado muitos resultados é a que se baseia em estudos etnobotânicos. Essa abordagem direciona as pesquisas farmacológicas para plantas que já vêm sendo utilizadas popularmente em tratamentos medicinais (BASSO et al., 2005). E, com certeza, uma grande fonte de informação sobre plantas com possíveis propriedades biológicas está nas medicinas tradicionais Chinesa e Indiana (Ayurveda), que são as mais difundidas ao redor do mundo.

A Medicina Tradicional Chinesa (MTC) apresenta muitos recursos naturais que vêm sendo utilizados em tratamentos terapêuticos a mais de 5000 anos. Esse sistema medicinal se baseia na mistura de diferentes plantas e até mesmo de produtos de origem animal ou mineral, para que os compostos presentes nestes elementos interajam entre si e obtenham o objetivo desejado, que é a cura da doença (ELVIN-LEWIS, 2001; YONG e LING, 2006). O componente principal da mistura, geralmente adicionado em maior quantidade, é o responsável pelo efeito terapêutico desejado; o componente secundário potencializa ou colabora com o efeito terapêutico deste. Já os demais componentes da mistura tratam dos sintomas periféricos, reduzem os efeitos tóxicos ou direcionam o componente majoritário ao órgão alvo (YONG e LING, 2006). Ainda segundo estes autores, a MTC considera a saúde como o equilíbrio existente no organismo como um todo. Os medicamentos seriam os elementos responsáveis pelo restabelecimento deste equilíbrio.

A Ayurveda, considerada a medicina tradicional indiana, também é, como já foi afirmado anteriormente, uma das mais conhecidas formas de tratamento medicinal baseada em conhecimentos tradicionais. Sua origem remonta de um passado distante, onde a filosofia e a medicina não se dissociavam (SMIT et al., 1995). Esse sistema de tratamento medicinal também se baseia no uso de misturas de diferentes plantas com atividades terapêuticas, com o objetivo de que os compostos presentes nessas plantas interajam entre si e com o organismo para se atingir a cura (SMIT et al., 1995; BALACHANDRAN e GOVINDARAJAN, 2005).

Menos difundida, mas não menos importante, é a medicina tradicional dos povos indígenas americanos, que também pode ser uma relevante fonte de informações sobre plantas com propriedades farmacológicas. De acordo com (ELVIN-LEWIS, 2001), esse sistema medicinal é o mais diversificado e ainda é praticado em comunidades onde a cultura tradicional se mantém intacta. Entretanto, não é apenas em comunidades isoladas que se faz uso dessas plantas em tratamentos medicinais. De acordo com (BORCHERS et al., 2000) existe um crescente interesse nas plantas utilizadas pelos povos indígenas por parte dos norte-americanos, que buscam uma forma de medicina complementar.

Como podemos ver, existe uma vasta fonte de informações, nas culturas antigas, acerca de plantas com potencial farmacológico. E estudos científicos vêm, a cada dia, comprovando a eficiência e a segurança dessas plantas e formulações.

Estudos realizados por Hashimoto et al. (1994) demonstraram que compostos extraídos de *Asiasarum sieboldi* apresentaram atividade antialérgica em

diferentes sistemas-teste, comprovando a eficiência dessa planta, que é prescrita pela MTC para tratamentos dessa doença. Outra planta utilizada pela MTC que teve sua atividade cientificamente comprovada foi a *Lithospermum erythrorhizon*, que é indicada para o tratamento de infecções (LIU et al., 1996).

Algumas formulações utilizadas pela Ayurveda também têm sido avaliadas quanto à sua eficiência. SMIT et al. (1995) demonstraram que algumas plantas empregadas pela medicina tradicional indiana no tratamento de diferentes tipos de câncer apresentam atividade citotóxica frente à uma linhagem de células tumorais. Uma revisão bibliográfica realizada por Balachandran e Govindarajan e publicada em 2005 descreve várias plantas utilizadas dentro da Ayurveda que apresentaram suas atividades anti-câncer comprovadas.

Mas não poderíamos deixar de citar também estudos realizados com plantas utilizadas pelos índios americanos. Vários estudos são relatados por (BORCHERS et al., 2000) em uma revisão que descreve a atividade anti-inflamatória de diferentes espécies utilizadas pelos povos indígenas norte-americanos. Atividades antimicrobiana, anti-inflamatória e anti-hiperglicêmica foram encontradas em plantas utilizadas por uma tribo indígena descendente dos Mayas (ANKLI et al., 2002).

Esses vários resultados descritos até aqui demonstram o valor que as terapias tradicionais ainda têm nos dias atuais. Além disso, demonstram a relevância de basear estudos de bioprospecção em estudos etnobotânicos, o que pode aumentar sensivelmente as possibilidades de se encontrar moléculas farmacologicamente ativas e de grande interesse para a sociedade moderna.

Mas não podemos nos esquecer dos riscos intrínsecos ao consumo desordenado de produtos derivados de plantas tidas como medicinais. Muitas plantas utilizadas por essas culturas antigas também tiveram atividades tóxicas descritas. Plantas utilizadas na dieta ou em tratamentos tradicionais têm mostrado atividade mutagênica (AMES, 1983; LIGHT et al., 2005) e, além disso, segundo Elgorashi et al. (2004) um herbicida conhecido por suas atividades mutagênica, carcinogênica e teratogênica foi isolado de plantas medicinais cultivadas. Existem também relatos de casos de hepatite tóxica derivada do consumo excessivo de cápsulas contendo produtos obtidos de *Croton cajucara* e que eram vendidos indiscriminadamente em academias de ginástica no Pará para o controle de obesidade (MACIEL et al., 1998).

Além dos exemplos acima, existe uma infinidade de outros casos descritos de toxicidade de produtos naturais. E esses riscos são ainda maiores quando o uso de tratamentos alternativos se dá de forma não controlada, sem a devida atenção, por parte do usuário, quanto à identificação correta da planta, à parte do vegetal a ser utilizada e à forma de preparo e administração.

Outro fator de risco para o consumo de plantas tidas como medicinais é que, apesar do aumento do interesse por parte do meio científico sobre esse assunto, ainda existe a falta de estudos que comprovem a eficácia e a segurança de tratamentos com espécies vegetais utilizadas pela população (DIAS e TAKAHASHI, 1994). Segundo Ames (1983), muitas substâncias obtidas de plantas têm sido descritas, porém, os estudos toxicológicos destas têm sido realizados muito lentamente, deixando obscuros seus efeitos à saúde humana.

1.3 Algumas espécies medicinais do cerrado

1.3.1 Espécies do Gênero *Alchornea*

A Família Euforbiaceae possui cerca de oito mil espécies vegetais distribuídas especialmente em regiões tropicais do planeta e divididas em aproximadamente 300 gêneros. O gênero *Alchornea* é um deles e totaliza perto de cinquenta espécies distribuídas nas regiões tropicais da América, África e Ásia.

Estas espécies apresentam um crescente interesse devido seus efeitos biológicos, incluindo atividades antioxidante (FAROMBI et al., 2003), antifúngica (ABO e ASHIDI, 1999), anti-inflamatória (OSADEBE e OKOYE, 2003), antimicrobiana, citotóxica contra as linhagens de células tumorais humanas Hep-G2 e A-431 (SETZER et al., 2000) e inibitória da replicação de HIV-1 e HIV-2 (AYISI e NYADEDZOR, 2003). Quimicamente, são encontrados em plantas do gênero *Alchornea*, alcalóides, flavonóides e outros compostos fenólicos, além de terpenóides (LAMIKANRA et al., 1990; EBI, 2001).

De acordo com Chitty (2004) a espécie *Alchornea castaneifolia* Willd. A. Juss. (Figura 3) se caracteriza morfológicamente como uma pequena árvore ou arbusto, com até três metros de altura, caule arredondado e folhas simples, alternadas e subcoriáceas, com aproximadamente 8-16 cm de comprimento e 2-5 cm de largura. Floresce de março a agosto e frutifica entre julho e setembro, ocorrendo frequentemente na beira de rios, em solos arenosos e argilosos.



Figura 3. *Alchornea castaneifolia* Willd. A. Juss.

As plantas dessa espécie são popularmente conhecidas como sarã ou gurupiá e utilizadas no tratamento de reumatismo, artrite, resfriados e dores musculares (DUKE e VASQUEZ, 1994). Segundo Dunstan et al. (1997) extratos obtidos dessa planta foram capazes de inibir a biossíntese de prostaglandina catalizada por COX-1 (Ciclooxigenase-1) *in vitro* e inibiram também edemas induzidos por etilfenilpropionato em orelhas de ratos. Porém, na literatura existem poucos estudos acerca de outras propriedades biológicas de compostos obtidos dessa espécie.

Alchornea glandulosa Poepp. & Endl. (Figura 4) é uma árvore dióica, com altura entre 10 e 20 metros e tronco de 50 a 70 cm de diâmetro. Apresenta folhas simples com 8 -16 cm de comprimento e entre 6-12 de largura. Seu florescimento ocorre geralmente duas vezes ao ano em maio-junho e em outubro-novembro. Seus frutos amadurecem em meados de outubro e em dezembro-janeiro (LORENZI, 2002).

Essa espécie é popularmente conhecida como tapiá, boleiro ou canela-raposa e sua distribuição abrange o Rio de Janeiro, além de ser encontrado desde Minas Gerais até o Rio Grande do Sul.



Figura 4. *Alchornea glandulosa* Poepp. & Endl.

De acordo com Conegero et al. (2003) foram encontrados nas folhas dessa espécie fitosteróides, terpenóides, alcalóides e compostos fenólicos. De acordo com esses mesmos autores o extrato metanólico dessas folhas apresentou efeito antimicrobiano, além de efeitos citostático e citocida frente à células tumorais humanas. Em outro estudo verificou-se que uma fração acetato obtida do extrato metanólico de folhas de *A. glandulosa* apresentou atividade anti-inflamatória (LOPES et al., 2005).

Alchornea triplinervia Spreng. Müll. Arg. (Figura 5), também conhecida como tapiá, boleiro ou tamanqueiro, é uma árvore que pode apresentar de 15 a 30 metros de altura e um tronco de 40 a 100 cm de diâmetro (LORENZI, 2002). Suas folhas são subcoriáceas, com 3-6 cm de comprimento. Sua distribuição abrange desde a Bahia até o Rio Grande do Sul e seu florescimento se dá entre outubro e novembro, com a frutificação entre dezembro e janeiro.



Figura 5. *Alchornea triplinervia* Spreng. Müll. Arg.

De acordo com Braca et al. (2002), foram encontrados flavonóides e taninos nas folhas dessa espécie, porém, ao contrário do que era esperado, não foram verificados alcalóides. Não foram encontrados estudos que avaliaram possíveis atividades biológicas para compostos obtidos dessa espécie.

1.3.2 *Anacardium humile* St. Hil.

Dentre as diferentes espécies vegetais presentes no cerrado e na Mata Atlântica, encontramos a família Anacardiaceae, com 79 gêneros e mais de 600 espécies. Possui distribuição predominante nas regiões tropicais e subtropicais de todo o mundo, ocorrendo também nas regiões temperadas (JOLY, 1975).

Um dos gêneros dessa família é o *Anacardium* ao qual pertence a espécie *A. humile* (Figura 6), popularmente denominado cajuzinho-do-campo. Segundo Correa (1974) se trata de um arbusto pequeno e lenhoso, com caule tortuoso, subterrâneo, às vezes comprido. Suas folhas são ovadolanceoladas, simples, róseas enquanto novas, pilosas. Suas flores são brancas, róseas ou amarelado-brancacentas com estrias roxas na base, dispostas em panículas. Fornece fruto (castanha) oleaginoso, comestível e saboroso, com pericarpo idêntico ao do *A. occidentale* L. (cajueiro) e do qual se extrai óleo-resina, igualmente aplicado para combater as moléstias cutâneas; o pedúnculo carnosos (caju mirim) é também saboroso, acidulo e refrigerante, considerado anti-sifilítico.

O povo distingue duas variedades de *A. humile*: branca e vermelha. As folhas de *A. humile* são empregadas pela população contra inflamações gerais e no tratamento da diarreia. Contudo, não existem estudos para a avaliação de atividades biológicas nem estudos fitoquímicos sobre essa espécie na literatura científica.



Figura 6. *Anacardium humile* St. Hil.

Vários metabólitos secundários vêm sendo encontrados em espécies do gênero *Anacardium*: flavonóides, ácidos anacárdicos (PARAMASHIVAPPA *et al.*, 2001), compostos voláteis como terpenos, aldeídos, hidrocarbonetos, ésteres, álcoois, cetonas, lactonas e norisoprenóides (BICALHO e REZENDE, 2001), taninos, biflavonóides C-glicosilados (MURTHY, 1982), derivados do ácido cinâmico, ácido elágico e alquenil catecóis (SHIN *et al.*, 1999). A espécie *A. occidentale* apresenta, segundo a literatura, atividades anti-inflamatória (OLAJIDE *et al.*, 2004), antimicrobiana (AKINPELU, 2001), hipoglicêmica (ALEXANDER-LINDO *et al.*, 2004), mutagênica e antimutagênica (MELO-CAVALCANTE *et al.*, 2003), dentre outras.

1.3.3 *Byrsonima basiloba* A. Juss.

A espécie *Byrsonima basiloba* A. Juss pertence à Família Malpighiaceae e é conhecida popularmente como murici ou murici-do-campo (Figura 7). De acordo com Lorenzi (2002) esta é uma espécie arbórea que pode atingir de 6 a 10 metros de altura, com tronco cilíndrico de 30 a 60 cm de diâmetro. Suas folhas são simples, coriáceas com 12-18 cm de comprimento e 3-7 cm de largura. É uma planta típica do Cerrado do Brasil Central. Seu florescimento ocorre durante todo ano, mas o pico se dá nos meses de verão. Da mesma forma a frutificação também ocorre durante todo ano, mas o período mais propício ocorre em abril-junho.



Figura 7. *Byrsonima* sp

Estudos fitoquímicos com espécies do gênero *Byrsonima* revelaram a ocorrência de sulfonoglicolipídios, fitoesteróides, triterpenos, ésteres aromáticos, aminoácidos, proantocianidinas e flavonóides (SANNOMIYA et al., 2005).

O uso popular de *B. basiloba* se dá, além de tratamento de úlceras gástricas, também no tratamento de diarreias. Porém, não existem na literatura relatos científicos de atividades efetivamente comprovadas para compostos derivados dessa espécie vegetal. Por outro lado, várias espécies desse gênero vêm sendo estudadas quanto aos seus efeitos biológicos. Segundo Sanomiya et al. (2005) produtos derivados de *B. crassa* apresentaram atividade antiúlcera. Porém, Cardoso et al. (2006) verificaram atividade mutagênica para essa espécie. Martínez-Vásquez et al. (1999), demonstraram que compostos derivados de *B. crassifolia* apresentam atividade antimicrobiana.

1.3.4 *Mouriri pusa* Gardner

A espécie *Mouriri pusa* Gardner (Figura 8) é popularmente conhecida como puçá-preto ou jabuticaba-do-cerrado e pertence à Família Melastomataceae. É uma pequena árvore, podendo medir de 2 a 7 metros de altura e apresenta frutos comestíveis bastante apreciados pelas populações nativas das regiões de cerrado (ANDREO et al., 2006).

Poucos estudos existem na literatura sobre a fitoquímica ou possíveis atividades biológicas dessa planta. De acordo com Andreo et al. (2006), o extrato apolar das folhas de *M. pusa* apresentou atividade antiulcerogênica. Estes mesmos autores descreveram vários tipos de flavonóides na constituição química dessa espécie vegetal. *Mouriri myrtilloides*, pertencente ao mesmo gênero, segundo Calderon et al.

(2000), apresentou atividade contra *Plasmodium falciparum*, bem como contra o vírus HIV e alguns tipos de células tumorais.



Figura 8. *Mouriri pusa* Gardner

1.3.5 Gênero *Qualea*

O gênero pertence à Família Vochysiaceae, que é constituída de árvores tropicais e apresenta duas sub-famílias, seis gêneros e aproximadamente 200 espécies. Dessas, três espécies são predominantes no cerrado brasileiro: *Q. grandiflora*, *Q. multiflora* e *Q. parviflora*.

Segundo Lorenzi (2002) os nomes populares de *Qualea grandiflora* Mart. (Figura 9) são pau-terra, pau-terra-do-campo ou ariauá e esta espécie pode chegar a 12 metros de altura, com caule de até 40 cm de diâmetro. Apresenta folhas simples, opostas e rígidas com 10-14 cm de comprimento. Sua ocorrência abrange

desde o Amazonas até São Paulo, sendo encontrada geralmente em terrenos altos, bem drenados e secos. Seu florescimento ocorre nos meses de novembro-janeiro e a maturação dos frutos ocorre geralmente nos meses de agosto-setembro, quando a planta está quase totalmente despida de sua folhagem.



Figura 9. *Qualea grandiflora* Mart.

As cascas, entrecascas e folhas de *Q. grandiflora* são usadas como adstringente e antidiarreico e para limpeza de úlceras externas e também contra inflamações (ALMEIDA et al., 1998)

De acordo com Hiruma-Lima et al. (2006) foram encontrados taninos, terpenóides, catequinas, fitoesteróides e saponinas no extrato hidroalcoólico dessa espécie que também, segundo estes mesmos autores, apresentou atividade antiulcerogênica. Além disso, esta espécie apresenta descrita também atividade antimicrobiana (ALVES et al. 2000) e anticonvulsante (GASPI et al., 2006).

Q. parviflora Mart. (Figura 10) é uma árvore de 6-10 metros de altura, com ramos tortuosos e caule com até 30 cm de diâmetro. Apresenta folhas simples, com 7-8 cm de comprimento e 2-3 cm de largura. É encontrada na Bahia, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul e São Paulo, sendo popularmente conhecida como pau-terra-de-flor-miudinha ou pau-terra-mirim. Sua floração se dá entre novembro e dezembro e o amadurecimento dos frutos se dá em setembro-outubro (LORENZI, 2002).



Figura 10. *Qualea parviflora* Mart.

Não foram encontrados na literatura estudos que descrevessem o perfil fitoquímico dessa espécie vegetal, bem como nenhum relato de atividades biológicas a ela creditadas.

Q. multiflora Mart. (Figura 11) também apresenta poucos estudos na literatura, sendo que o único encontrado descreve uma atividade contra o molusco *Biomphalaria glabrata* (SOUZA et al., 1984).



Figura 11. *Qualea multiflora* Mart.

1.3.6 *Strychnos pseudoquina* St. Hil.

Strychnos pseudoquina St. Hil. (Figura 12) é popularmente conhecida como quina, quineira ou quina-do-campo, dentre outros. Pertence à Família Loganiaceae, sendo uma árvore com 4-9 metros de altura e tronco tortuoso, com até 40 cm de diâmetro, e casca bastante grossa, que geralmente se descama em placas. Suas folhas são opostas e simples, com 5-12 cm de comprimento e 2-6 cm de largura.

Sua ocorrência se dá nos cerrados, campos cerrados e cerradões do Brasil Central e do Estado de São Paulo. Seu florescimento se dá nos meses de dezembro até março, com amadurecimento dos frutos em julho-setembro (LORENZI, 2002).



Figura 12. *Strychnos pseudoquina* St. Hil.

Esse gênero é famoso por um dos alcalóides produzidos por algumas das espécies vegetais que a ele pertencem, a estriquinina, que é um poderoso veneno que pode causar paralisia do sistema respiratório e conseqüentemente a morte (THONGPHASUK et al., 2004). Segundo Silva et al. (2005), *S. pseudoquina* apresenta em sua constituição alcalóides e flavonóides, sendo que tanto o extrato metanólico de suas folhas quanto uma fração de alcalóides apresentaram atividade antiulcerogênica. Outro estudo demonstrou que, apesar do nome popular (quina) e da recomendação tradicional para o tratamento de malária, *S. pseudoquina* não apresenta o alcalóide quinino e nem mesmo qualquer atividade sobre o agente causador dessa doença (ANDRADE-NETO et al., 2003).

1.4 Princípios de Mutagênese

O DNA (ácido desoxirribonucléico) é o material genético de todos os seres vivos e de muitos vírus, sendo a seqüência de bases nitrogenadas a forma na qual a informação genética é armazenada (LEWIN, 2001). Por apresentar essa função fundamental, o DNA é bastante protegido, sendo a única molécula biológica que apresenta um mecanismo próprio para prevenção e reparo de falhas em seu metabolismo (LEHNINGER et al., 1995). Entretanto, ainda assim está sujeito a mutações que, segundo Zaha (1996), são alterações súbitas no conjunto gênico de um organismo que não são explicáveis pela recombinação da variabilidade genética preexistente. Estas alterações, segundo Lewin (2001) podem ser decorrentes de processos celulares normais (mutações espontâneas) ou devidas à exposição do organismo a agentes químicos ou físicos (mutações induzidas).

As mutações despertam grandes interesses por estarem diretamente relacionadas ao desenvolvimento de diversas doenças degenerativas tais como câncer e arteriosclerose (DE FLORA, 1998; SEO et al., 2000). Em nosso cotidiano estamos constantemente em contato com agentes mutagênicos como a radiação solar, poluentes presentes no ar e na água ou mesmo elementos presentes em nossa dieta.

Além disso, estima-se que milhões de trabalhadores são expostos em sua rotina de trabalho a compostos químicos, dos quais muitos têm conhecida ação mutagênica e/ou carcinogênica (ONG et al., 1986; HONGPING et al., 2006). Tem-se documentado, por exemplo, os riscos aos quais estão sujeitos os agricultores excessivamente expostos a pesticidas, agentes químicos que têm demonstrado

citotoxicidade e genotoxicidade em células humanas (HOYOS et al., 1996; LIOI et al., 1998; MARQUEZ et al., 2005) e toxicidade fetal elevada em camundongos (PEÑA et al., 1999).

A conversão de células normais em células neoplásicas normalmente envolve vários passos. Uma das fases iniciais desse processo envolve a ação de um carcinógeno genotóxico (WEISBURGER, 2000). Entretanto, segundo Alberts et al. (2002), uma única mutação não é suficiente para converter uma célula sadia típica numa célula cancerosa. Eles afirmam que várias evidências indicam que a gênese de um câncer requer, como regra geral, que vários acidentes raros e independentes ocorram juntos em uma célula.

A avaliação da genotoxicidade pode ser realizada nos diferentes passos de interação do agente mutagênico com o DNA ou de seus efeitos. A capacidade do composto se ligar ao material genético pode ser avaliada pela observação de aductos no DNA; a capacidade de quebrar o DNA pode ser estimada por eluição alcalina ou pelo teste do Cometa e as mutações cromossômicas e/ou genômicas podem ser quantificadas pelos testes do micronúcleo ou aberrações cromossômicas (VAN GOETHEM et al., 1997).

Segundo Gebhart (1992), as metodologias citogenéticas clássicas usadas para avaliar a mutagenicidade de agentes químicos e físicos em mamíferos também podem ser empregadas para avaliação e identificação de agentes antimutagênicos. Gebhart (1992) e Kuroda et al. (1992) reportaram a importância do uso destes sistemas, principalmente para avaliar o mecanismo de ação de agentes

antimutagênicos e anticlastogênicos usando diferentes tratamentos com agentes químicos.

O interesse na identificação de produtos naturais ou sintéticos que possam ter propriedades antimutagênicas ou anticarcinogênicas tem aumentado gradativamente, pois o conhecimento de tais produtos pode ser útil como medida preventiva para o ser humano no combate a vários males. O descobrimento de produtos que reduzem a taxa de mutações fatalmente diminuiria a incidência de câncer e outras doenças degenerativas, pois o homem poderia aumentar a exposição a determinados agentes antimutagênicos efetivos (HAYATSU et al, 1988), especialmente através da dieta (WATTEMBERG, 1983; RAMEL et al, 1986).

1.5 Sistemas-teste para Avaliação de Mutagenicidade/Antimutagenicidade

1.5.1 Teste de Ames (*Salmonella*/Microsome Assay)

O teste de Ames tem sido amplamente utilizado para identificar mutágenos entre substâncias puras, misturas complexas e amostras ambientais. Caracteriza-se pela utilização de linhagens indicadoras de *Salmonella typhimurium* sensíveis à substâncias capazes de induzir diferentes tipos de mutação. Na presença de agentes mutagênicos, estas linhagens revertem seu caráter de auxotrofia para a síntese de histidina e passam a formar colônias em meio desprovido desse aminoácido. Desta forma, através da contagem de colônias por placa é possível estabelecer a ação mutagênica de um composto em função de sua concentração (ZEIGER, 2001). Um considerável número de mutágenos primeiramente identificados pelo teste de Ames se

mostraram carcinogênicos em ensaios com animais (MARON e AMES, 1983). Isso faz com que esse teste seja um dos principais ensaios empregados na determinação da mutagenicidade de um grande número de compostos químicos (UMBUZEIRO e VARGAS, 2003).

Existe uma variedade de linhagens bacterianas que podem ser empregadas neste ensaio. Cada uma delas apresenta várias mutações específicas que resultam, além da incapacidade de sintetizar histidina, em outras características particulares, que as tornam mais hábeis para a identificação de diferentes classes de agentes químicos genotóxicos (MARON e AMES, 1983).

As mutações no operon histidina também são diferentes de acordo com a linhagem. E essas diferenças permitem identificar o mecanismo de ação de diferentes agentes químicos, isto é, determinadas linhagens identificam agentes mutagênicos que causam substituição de pares de bases e outras linhagens identificam agentes químicos que causam mutações do tipo *frameshift* (MARON e AMES, 1983; MORTELMANS e ZEIGER, 2000).

Entretanto, as linhagens bacterianas não apresentam enzimas de metabolização, o que impossibilita sua capacidade para identificação de agentes mutagênicos de ação indireta. Para superar essa dificuldade, adiciona-se às culturas durante os ensaios a chamada fração S9, que contém enzimas metabolizadoras de xenobióticos, e é obtida a partir do fígado de ratos (MARON e AMES, 1983; MORTELSMANS e ZEIGER, 2000).

Todas essas características conferem ao Teste de Ames uma grande capacidade de identificação e caracterização de diferentes agentes mutagênicos, com grande eficiência e sensibilidade.

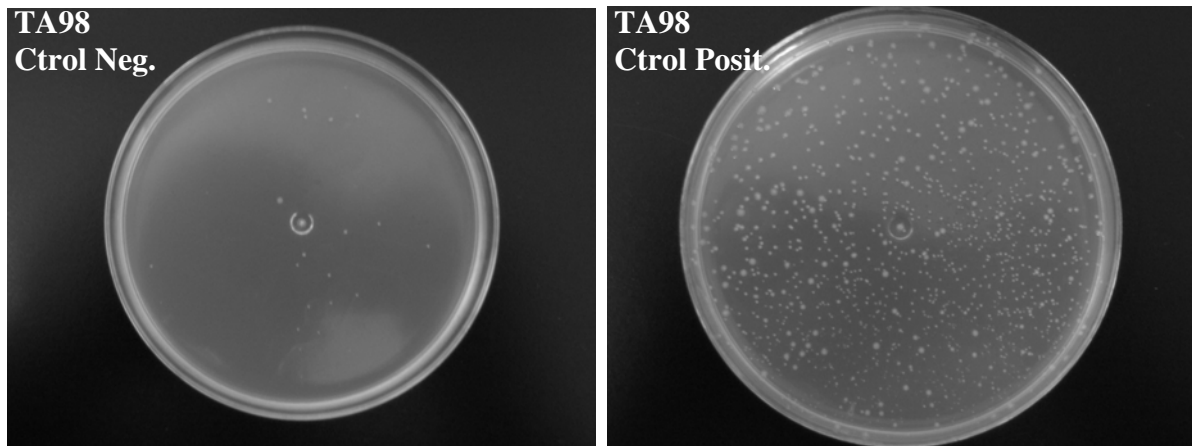


Figura 13. Placas com *Salmonella typhimurium* (Teste de Ames)

1.5.2 Teste do Micronúcleo

Micronúcleos têm sido estudados há muitos anos e frequentemente usados para quantificar a exposição a agentes químicos ou à radiação (TUCKER e PRESTON, 1996; MAJER et al., 2001), sendo o primeiro procedimento de uma série de ensaios sugeridos por diversas agências de pesquisa em todo o mundo para estudos de genotoxicidade (KRISHNA e HAYASHI, 2000).

Os micronúcleos foram primeiramente descritos por Howell em 1891 como inclusões citoplasmáticas em células vermelhas do sangue de gatos anêmicos. Jolly observou essas mesmas estruturas em 1901 em seus estudos com eritrócitos de embriões de ratos (SLESINSKI e GUZZIE, 1988). Segundo Heddle et al. (1983)

diferentes mecanismos podem estar envolvidos na formação dos micronúcleos, incluindo quebras cromossômicas (clastogênese) e rompimento das fibras do fuso mitótico (aneuploidiogênese). Isso ocasiona a formação de um “pequeno núcleo”, envolto por membrana (micronúcleo), isolado do núcleo principal, mas corado similarmente a este, devido ao seu conteúdo de DNA (SLESINSKI e GUZZIE, 1988).

Embora os micronúcleos possam ser originados espontaneamente, a sua indução é comumente usada para se detectar danos genotóxicos resultantes de exposição a agentes mutagênicos (HEDDLE, et al., 1983; MAJER et al., 2001). O teste do Micronúcleo é uma alternativa à análise de aberrações cromossômicas. Entretanto, somente um pequeno grupo de todos os possíveis tipos de aberrações cromossômicas aparecem como micronúcleos (GRAWÉ et al. 1998).

Segundo Surrallés e Natarajan (1997), as principais vantagens da análise de células micronucleadas são a velocidade e a facilidade com que este tipo de estudo pode ser efetuado, especialmente quando é aplicado em roedores em estudos *in vivo*, além de permitir a inferência de processos de aneugênese e clastogênese, como já afirmado anteriormente.

Hayashi et al. (1990) descreveram uma técnica para a análise de células micronucleadas do sangue periférico de camundongos com a utilização de lâminas pré-coradas com o corante fluorescente acridine orange, que proporciona coloração amarela ao DNA e vermelha ao RNA (Figura 14). Essas propriedades permitem a identificação dos reticulócitos, eritrócitos jovens ricos em RNA em nível de citoplasma, que se coram em vermelho pela presença desse ácido nucléico. Os

micronúcleos, por seu conteúdo de DNA, se coram em amarelo e se tornam muito evidentes nestas células.

Segundo Kishi et al. (1992), em estudos comparativos entre a técnica convencional de coloração por giemsa de células da medula óssea de camundongos e a técnica de coloração descrita por Hayashi et al. (1990) esta última se mostrou tão sensível quanto a primeira. Ainda segundo esse mesmo autor, esse método que utiliza lâminas pré-coradas com acridine orange é de realização ainda mais fácil e rápida, por não ser necessário processamento do material biológico antes do preparo das lâminas e nem a fixação prévia à coloração. A facilidade para análise é também um ponto destacado por Kishi et al. (1992).

As principais vantagens da utilização do sangue periférico para a análise de Micronúcleos foram apontadas por MacGregor et al. (1980) apud CSGMT (1992) como sendo o fato de que um mesmo animal pode fornecer várias amostras de material, sem a necessidade do sacrifício, a simplicidade da preparação das amostras e a abundância e uniformidade da população.

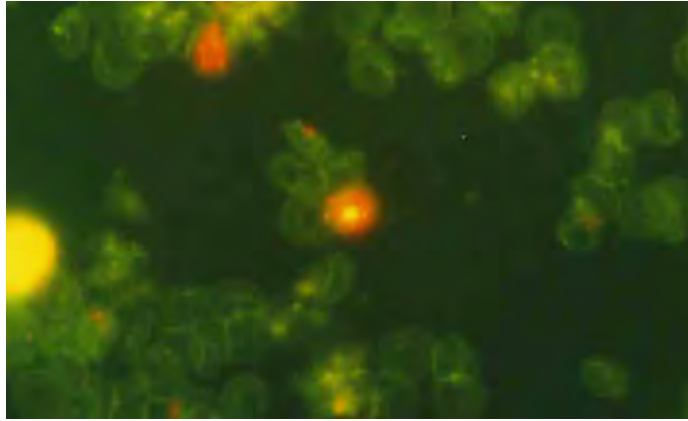


Figura 14. Reticulócito micronucleado (coloração: Acridine Orange;

1000x)

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

Avaliar a mutagenicidade de compostos provenientes de 10 diferentes espécies vegetais nativas do cerrado brasileiro: *A. castaneifolia*, *A. glandulosa*, *A. triplinervia*, *B. basiloba*, *M. pusa*, *Q. grandiflora*, *Q. multiflora*, *Q. parviflora* e *S. pseudoquina*.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar, para cada uma das espécies vegetais, a mutagenicidade *in vitro* de um extrato polar e um extrato apolar, empregando-se o teste de Ames;
- Avaliar, também empregando-se o teste de Ames, a mutagenicidade de algumas frações enriquecidas e substâncias puras, obtidas das diferentes espécies vegetais;
- Avaliar a mutagenicidade *in vivo* dos extratos polares, empregando-se o teste do Micronúcleo em células do sangue periférico de camundongos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Espécies Vegetais Estudadas

Todas as espécies estudadas no presente trabalho estão inseridas em um projeto temático de bioprospecção coordenado pelo professor Wagner Vilegas, do Instituto de Química da UNESP de Araraquara – SP, e intitulado: USO SUSTENTÁVEL DA BIODIVERSIDADE BRASILEIRA: PROSPECÇÃO QUÍMICO-FARMACOLÓGICA EM PLANTAS SUPERIORES (**Processo: 02/05503-6**). Esse projeto faz parte do programa Biota-Fapesp.

A escolha das espécies a serem avaliadas dentro deste projeto temático se baseou em estudos etnofarmacológicos conduzidos pela Prof^a Dr^a Clélia Akiko Hiruma-Lima, do Instituto de Biociências da UNESP de Botucatu – SP. Esses estudos buscaram conhecimentos tradicionais acerca do uso de plantas nativas do cerrado no tratamento de úlceras gástricas.

Porém, o projeto temático supracitado não busca apenas a identificação de compostos com potencial no tratamento de úlceras gástricas. Várias outras atividades biológicas vêm sendo avaliadas por um grupo multidisciplinar, composto por pesquisadores da Universidade de Campinas (UNICAMP), da Universidade Estadual Paulista (UNESP) e da Universidade Estadual de Londrina (UEL). Esse grupo vem avaliando os compostos vegetais quanto às suas atividades anti-inflamatória, antimicrobiana, antimicobacteriana, antioxidante e também quanto ao seu potencial mutagênico.

Sendo assim, no presente estudo, foram avaliados quanto à mutagenicidade compostos obtidos de dez diferentes espécies vegetais nativas do cerrado brasileiro.

Três espécies pertenciam ao gênero *Alchornea*: *A. castaneifolia*, *A. glandulosa* e *A. triplinervia*, sendo estas as espécies predominantes desse grupo taxonômico no estado de São Paulo. As folhas de *A. triplinervia* utilizadas nesse trabalho foram coletadas no Jardim Botânico do Instituto de Biociências da UNESP de Botucatu por Tamara Regina Calvo (IQ-UNESP-Araraquara) e Luis Fernando Rolim (IB-UNESP-Botucatu), com a identificação Botânica sendo realizada pelo Prof. Jorge Tamashiro, do Instituto de Biociências da UNICAMP.

Os mesmos coletores recolheram o material vegetal de *A. glandulosa* na Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queirós” (ESALQ-USP) em Piracicaba-SP, com a identificação também sendo realizada por Jorge Tamashiro e a excicata foi depositada no Herbário da Universidade de Campina (UNICAMP) sob o nº132828.

O material vegetal de *A. castaneifolia* foi coletado pela prof.^a Clelia A. Hiruma Lima em Palmas (TO). A identificação foi realizada pela prof.^a Solange de Fátima Lólis e a excicata foi depositada no Herbário da Universidade do Tocantins com o seguinte número: TO 4321.

Outra espécie estudada nesse projeto foi *Anacardium humile*, cujo material vegetal (folhas) foi coletado na cidade de Porto Nacional (TO) e a excicata se encontra catalogada no Herbário da Universidade de Tocantins sob o nº HTO 1922. A identificação do material vegetal foi realizada pelo botânico Eduardo Ribeiro, da

UFTO, com o auxílio da profa. Clelia A. H. Lima, do Instituto de Biociências de Botucatu – UNESP.

As folhas de *Byrsonima basiloba* foram coletadas por Luís Fernando R. de Almeida (IBB-UNESP-Botucatu, SP) no município de Pratânia-SP e identificadas por Dr. José Clemente Campos do IB-Botucatu. A exsicata de número 24163 encontra-se depositada no herbário da Unesp- Botucatu.

O material vegetal (folhas) de *Mouriri pusa*, que também foi submetido à análises de mutagenicidade, foi coletado em Porto Nacional, Tocantins. A identificação botânica foi realizada pela Prof^a. Solange de F. Lolis da Universidade Federal do Tocantins. A exsicata foi depositada no Herbário HTINS sob o n° 4548.

Para a realização dos ensaios de mutagenicidade com *Strychnos pseudoquina*, o material vegetal (folhas) foi coletado em Porto Nacional (TO) e identificado pelo Dr. Eduardo Ribeiro dos Santos, da Universidade Estadual do Tocantins. Uma exsicata está catalogada no Herbário da Universidade Estadual do Tocantins com o n° 3291.

3.2 Preparo dos Extratos Vegetais

Todas as extrações dos compostos vegetais estudados quanto à mutagenicidade foram realizadas no Instituto de Química da UNESP, *campus* Araraquara-SP, sob coordenação do Prof. Dr. Wagner Vilegas. De cada espécie vegetal foram obtidos dois extratos, um extrato polar e um extrato apolar, permitindo

uma melhor caracterização dos compostos presentes nessas espécies, bem como de seus possíveis efeitos sobre o DNA. Para obtenção dos extratos apolares foram utilizados como solvente o clorofórmio (CHCl_3) ou o diclorometano (DCM); para os extratos polares foi utilizado o metanol (MeOH).

O esquema genérico a seguir (Figura 15) resume o processo empregado para a obtenção dos extratos das diferentes espécies vegetais estudadas.

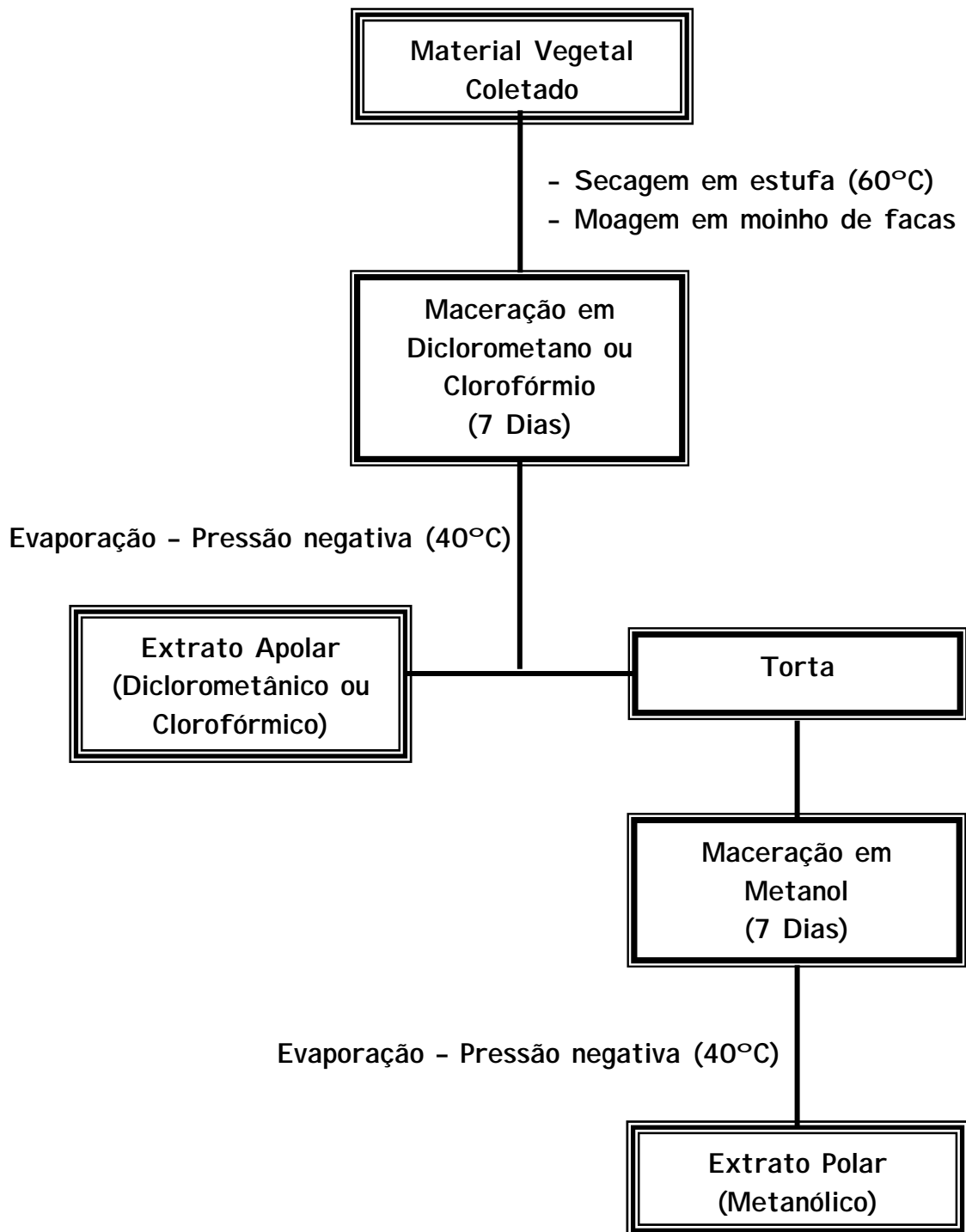


Figura 15. Esquema genérico de obtenção dos extratos vegetais

3.3 Obtenção das Frações Enriquecidas e Substâncias Puras

Além dos extratos vegetais citados anteriormente, foram avaliadas duas frações enriquecidas, obtidas do extrato metanólico de *M. pusa*, e três frações enriquecidas e uma substância pura obtida do extrato metanólico de *S. pseudoquina*. Esses procedimentos foram também realizados no Instituto de Química da UNESP de Araraquara, sob coordenação do Prof. Dr. Wagner Vilegas.

3.3.1 Frações Enriquecidas de Flavonóides e Taninos de *M. pusa*

A obtenção das frações enriquecidas de taninos e flavonóides, a partir do extrato metanólico de *M. pusa*, seguiu o procedimento representado pela Figura 16. O extrato foi dissolvido numa quantidade V de metanol, sendo, em seguida, adicionado uma quantidade de aproximadamente 8V de Acetato de Etila, ocorrendo então precipitação. A porção precipitada e o sobrenadante são separados e secos. A primeira porção é a chamada Fração Enriquecida de Taninos (FET). A massa seca do sobrenadante foi então dissolvida em Hexano/Diclorometano 1:1 (v/v). Após centrifugação o sobrenadante foi submetido à uma coluna Sephadex LH-20 para separação da Fração Enriquecida de Flavonóides.

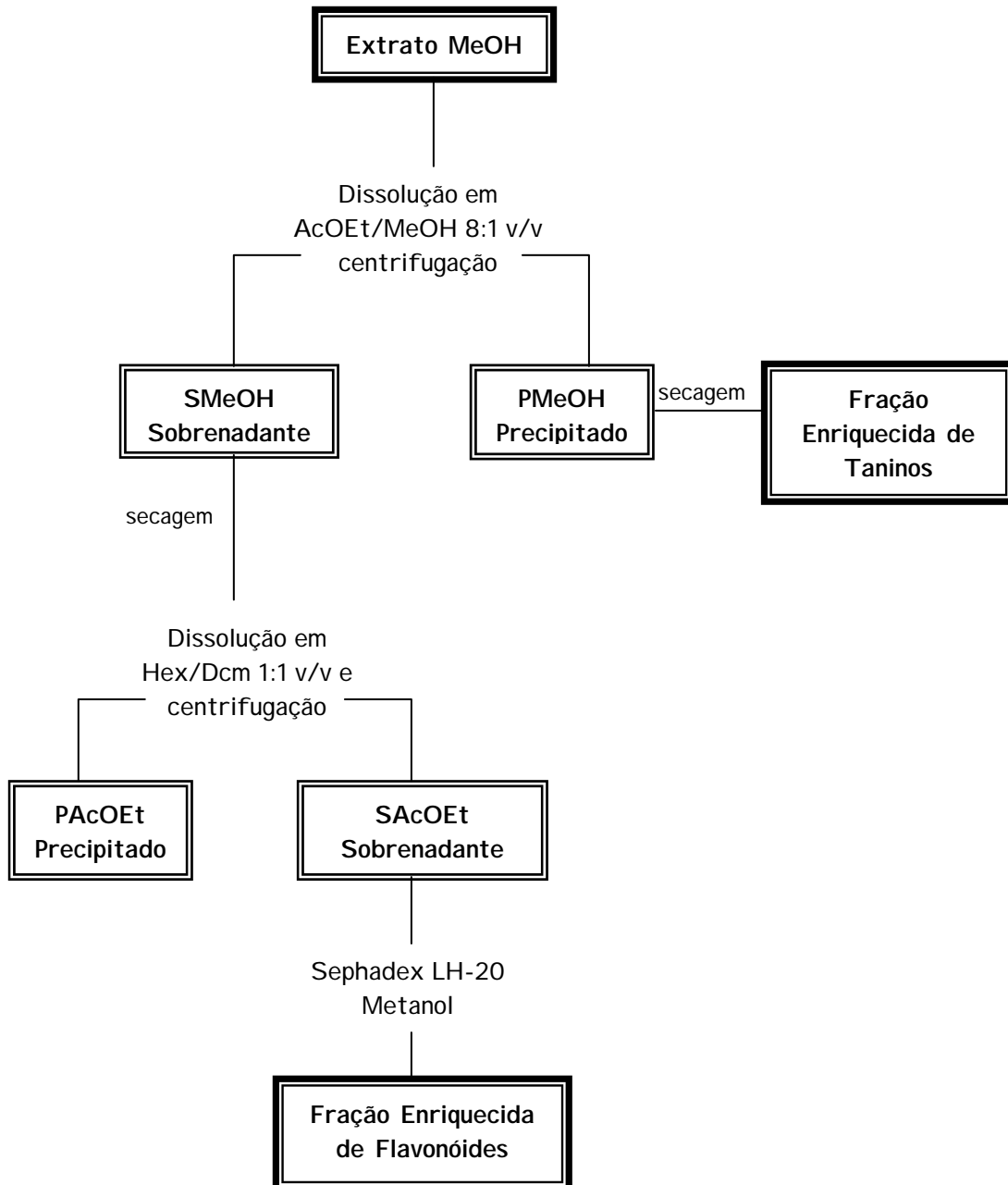


Figura 16. Esquema da obtenção das frações enriquecidas do extrato metanólico de *M.*

pusa

3.3.2 Frações Enriquecidas de Flavonóides e Alcalóides de *S. pseudoquina*

Uma porção do extrato metanólico de *S. pseudoquina* foi submetida a uma coluna cromatográfica Sephadex LH-20, com metanol como eluente. Cem frações foram coletadas e checadas por Cromatografia em Camada Delgada, em placas de sílica-gel, com fase móvel $\text{CHCl}_3\text{-MeOH-n-PrOH-H}_2\text{O}$ (5:6:1:4, v/v/v/v), com revelação utilizando os reagentes Dragendorff, iodoplatinato ou NP/PEG (Natural Products/Polyethyleneglycol). Alcalóides foram detectados nas frações 3-29 (Fração Enriquecida de Alcalóides – FEA), e flavonóides foram detectados nas frações 35-90 (Fração Enriquecida de Flavonóides – FEF). As frações 30-35 (Fração Intermediária – FI) continha uma mistura de alcalóides, flavonóides e outros compostos não identificados. Uma parte da FEA foi então purificada, obtendo-se um alcalóide inédito, denominado alcalóide 1.

3.4 Doses Utilizadas

Nos ensaios *in vitro* (Teste de Ames) foram testadas 5 concentrações dos diferentes extratos vegetais. As doses foram determinadas em estudos de triagem empregando-se a linhagem TA98 ou TA100, testando-se doses decrescentes obtidas a partir do limite de solubilidade (maior concentração possível) de cada um dos derivados vegetais. Todos os extratos vegetais avaliados através do teste de Ames foram diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO). Também foram avaliadas diferentes

concentrações (pelo menos 4) de frações enriquecidas obtidas de algumas das espécies vegetais já apresentadas. Essas frações também foram diluídas em DMSO.

Nos testes de mutagenicidade *in vivo* foram empregadas três doses de cada extrato vegetal. As doses foram escolhidas com base no limite de solubilidade dos extratos em água destilada, correspondendo a 50, 75 e 100% dessa concentração. Cada um dos extratos vegetais foi diluído em água destilada e administrados via gavagem aos animais, num volume máximo de 0,3 mL. Apenas os extratos metanólicos foram avaliados devido à dificuldade de dissolução dos extratos apolares em água destilada ou qualquer outro solvente apropriado a estudos de mutagenicidade *in vivo*.

3.5 Animais

Foram utilizados camundongos da espécie *Mus musculus* (Swiss albino) com aproximadamente 30 g de peso corpóreo, provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina. Os animais foram mantidos em caixas individuais de polipropileno, com tampa-grade, durante o período de tratamento, com água e alimento *ad libitum*, ciclo claro/escuro de 12 horas e temperatura de 23 ± 2 °C.

O projeto de pesquisa para o desenvolvimento desse trabalho foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP de Araraquara, sendo toda a metodologia de experimentação com animais aprovada.

Para os tratamentos os animais foram divididos em grupos de 10, sendo 5 machos e 5 fêmeas. Cada um deles recebeu as diferentes doses dos extratos vegetais via gavagem, num volume máximo de 0,1 ml para cada 10 g de peso corpóreo.

3.6 Teste de Ames

3.6.1 Linhagens utilizadas

Foram utilizadas as linhagens TA98, TA97a, TA100 e TA102 de *Salmonella typhimurium*, gentilmente cedidas pelo Dr. Bruce Ames da Universidade de Berkeley, Califórnia, USA. A cepa TA98 apresenta mutação no gene *hisD* (*hisD3052*) que codifica para a histidinol desidrogenase, apresentando como ponto preferencial para a reversão oito resíduos repetitivos de GC e detecta compostos mutagênicos que causam deslocamento do quadro de leitura do DNA. A mutação *hisG46* presente na cepa TA100 ocorre no gene que codifica a primeira enzima do processo de biossíntese da histidina, através da substituição do códon selvagem GGG (CCC) – prolina – por GAG (CTC) – leucina. Assim, essa cepa detecta agentes mutagênicos que ocasionam substituições, principalmente neste par G-C. A cepa TA102 contém a mutação ochre TAA no gene *hisG* e detecta eficientemente mutágenos como formaldeído, glioxal, vários hidroperóxidos, bleomicina, fenilidrazina, raios-X, luz UV, estreptonigrina e agentes cross-link, como mitomicina-C. A cepa TA97a também detecta mutágenos do tipo *frameshift* e apresenta mutação no gene *his D 6610* e alvo para mutação os resíduos GC (Maron e Ames, 1983).

3.6.2 Manutenção e estoque das cepas de *S. typhimurium*

As cepas de *S. typhimurium* foram mantidas em tubos para congelamento (1,5mL) à -70°C para que se mantivessem inalteradas todas as suas características genéticas. Para cada 0,9 ml de cultura foi adicionado 0,1 ml de DMSO substância crioprotetora.

3.6.3 Verificação das características genéticas das cepas de *S. typhimurium*

As características genéticas das cepas de *S. typhimurium* foram checadas rotineiramente, antes do preparo dos estoques para congelamento. A dependência da histidina, presença de mutação *rfa*, presença de deleção *uvrB*, presença de plasmídios de resistência e taxa de reversão espontânea foram verificados de acordo com Maron e Ames (1983).

3.6.4 Preparo dos inóculos de *S. typhimurium* utilizados no ensaio

Com auxílio de alça de inoculação, pequena quantidade da cultura estoque congelada era semeada em 30mL de caldo nutriente (Oxoid n. 2), incubada a 37 °C, por 12-16 horas, em banho-maria (37°C) com agitação (160 rpm), de modo a obter uma densidade de $1-2 \times 10^9$ bactérias/ml.

3.6.5 Meios de cultura

Os meios de cultura e soluções necessários para os ensaios de mutação reversa foram preparados de acordo com as especificações de Maron e Ames (1983). Nos ensaios de mutagenicidade foi usado ágar mínimo glicosado (AMG), constituído de ágar glicose (20 g de glicose, 15 g de Bacto ágar e 930 mL de água destilada) e Meio Vogel Bonner “E” 50x concentrado (10 g de sulfato de magnésio heptahidratado, 100 g de ácido cítrico, 175 g de fosfato de sódio e amônio, 500g de fosfato de potássio dibásico e 670 ml de água destilada) na proporção de 980 ml para 20 ml respectivamente.

O ágar de superfície (“top-agar”) era composto de 0,5 g de cloreto de sódio, 0,6 g de Bacto ágar e 100 ml de água destilada, acrescido de 10 ml de uma solução de L-histidina 0,096 mg/ml (Sigma) e D-biotina 0,123 mg/ml (Sigma).

Os meios de cultura foram preparados e esterilizados em autoclave a 121°C por 15 minutos.

3.6.6 Preparo da mistura de S9

Foi utilizada a fração microssomal S9 homogeneizada de fígado de rato (fração pós-mitocondrial, suplementada com um cofator, preparada a partir de fígado de roedores tratados com agentes indutores de enzimas, arocloror 1254). O uso da fração S9 permite inferir se uma substância ou amostra é mutagênica em sua forma

original ou se necessita ser metabolizada ou ativada para se tornar mutagênica. Essa fração foi obtida comercialmente da MOLTOX (Molecular Toxicology, Inc.USA). Para o preparo da mistura S9, todas as soluções (cloreto de magnésio 0,4M e cloreto de potássio 0,4M, glicose-6-fosfato 1M, β -nicotinamida adenina dinucleotidifosfato 0,1M, tampão fosfato 0,2M pH 7,4 e água destilada) inclusive a fração S9 hidratada, foram mantidas em banho de gelo durante todo o ensaio, preparadas sempre a fresco e utilizadas por um período de no máximo 3 horas.

3.6.7 Controles

O controle negativo foi realizado com DMSO, o solvente dos extratos vegetais. Os ensaios foram realizados incluindo-se também controles positivos para confirmar as propriedades de reversão e especificidade de cada cepa. Foram utilizados como controle positivo em ensaios sem ativação metabólica o 4-Nitrofenilenodiamina (NPD) para as linhagens TA98 e Ta97a, Azida Sódica para a linhagem TA100 e Daunomicina para a linhagem TA102. Nos ensaios com ativação metabólica foi empregado o composto 2-antramina para todas as linhagens.

3.6.8 Ensaio de mutagenicidade

De acordo com a metodologia de pré-incubação, desenvolvida por Maron e Ames (1983), diferentes concentrações dos extratos vegetais foram misturadas a 0,5 ml de tampão fosfato 0,2M pH 7,4, 0,1 ml de cultura de bactérias e

incubadas de 20-30 minutos a 37°C. Nos ensaios com ativação metabólica, foram adicionados, em substituição ao tampão fosfato, 0,5 ml da mistura S9. Decorrido o tempo de incubação, 2 ml de “top ágar”, contendo traços de L-histidina e D-biotina, foram adicionados a mistura presente nos tubos. O conteúdo de cada tubo, assim composto, foi levemente homogeneizado em vórtex e vertido sobre a superfície de uma placa contendo ágar mínimo glicosado. Após solidificação do “top-ágar”, as placas foram incubadas por 48 horas, a 37°C. Ao término desse período, foi realizada a contagem do número de colônias revertentes por placa. Os ensaios foram realizados em triplicata.

3.7 Teste do Micronúcleo

O protocolo adotado para a realização de nossos trabalhos foi o descrito por Hayashi et al. (1990), no qual se empregam lâminas pré-coradas por acridine orange.

3.7.1 Preparo das lâminas com Acridine Orange

As lâminas (bem limpas) foram aquecidas em uma placa aquecedora a aproximadamente 70°C. Com as lâminas quentes, colocou-se 10µl de solução de acridine orange (1 mg/ml) sobre a lâmina e fazendo-se o espalhamento utilizando a extremidade de outra lâmina bem limpa. As lâminas foram secas ao ar e guardadas em caixa apropriada, a temperatura ambiente, em local escuro, por pelo menos 24h.

3.7.2 Obtenção do sangue e preparo das células

Com o auxílio de uma agulha, a cauda dos animais foi perfurada, coletando-se 5µl de sangue (uma gota) e depositando-o no centro da lâmina previamente preparada com acridine orange, cobrindo-a com lamínula. As lâminas com o material biológico foram mantidas a -20°C, no escuro, por no mínimo 24 horas antes da análise citológica, propiciando uma melhor ação do corante.

A análise citológica das lâminas contendo o sangue periférico dos animais foi efetuada o mais rápido possível, para evitar a deterioração do material. Esta análise foi realizada em microscópio de fluorescência, combinando luz azul (488 nm) e filtro amarelo. Foram contados 1000 reticulócitos por animal e anotadas as frequências de células micronucleadas.

3.7.3 Ensaio de Mutagenicidade

Para avaliação da mutagenicidade *in vivo* dos extratos obtidos de plantas medicinais nativas do Bioma Cerrado, foram empregados camundongos Swiss albinos (com cerca de 30g). Foram avaliadas três doses de cada um dos extratos vegetais, administradas aos animais via gavagem.

Foi estabelecido um grupo controle positivo para cada uma das espécies vegetais avaliadas quanto à mutagenicidade, no qual os animais foram tratados via intraperitoneal com ciclofosfamida (50 mg/kg p.c.). O grupo controle

negativo recebeu, via gavagem, 0,3 ml de água destilada, uma vez que esse foi o solvente empregado para a dissolução dos extratos estudados.

Foram coletadas amostras de sangue da cauda dos animais antes de cada tratamento, obtendo-se assim a frequência basal de micronúcleos para cada indivíduo (controle-interno). Trinta horas depois da administração dos compostos-teste aos animais, foi feita uma nova coleta de sangue para verificação da mutagenicidade aguda dos extratos vegetais através do teste do micronúcleo em células do sangue periférico.

3.8 Análise Estatística dos Resultados

3.8.1 Teste de Ames

Os dados da mutagenicidade dos extratos vegetais foram analisados utilizando o programa estatístico Salanal elaborado e gentilmente cedido pelo Dr. L. Myers do Research Triangle Institute, RTP, Carolina do Norte, USA, por intermédio da Dr^a Maria Ines Sato (CETESB). Esse programa permite avaliar o efeito dose-resposta através do cálculo da análise de variância (ANOVA – teste F) entre as médias do número de revertentes nas diferentes doses testadas e o controle negativo, seguido de uma regressão linear. O modelo do programa escolhido para a análise dos dados foi o modelo Bernstein (BERNSTEIN et al., 1982).

A Análise de Variância (ANOVA) é um procedimento estatístico para análise de testes de hipótese, utilizado na comparação de médias de dois ou mais tratamentos de uma amostra. Nessa análise, são levadas em consideração a **variabilidade dentro** (quanto maior a variabilidade dentro de uma amostra, maior a dificuldade para concluir que os tratamentos são diferentes) e a **variabilidade entre** (quanto maior a variabilidade entre as amostras maior a evidência de que existem diferenças entre os tratamentos).

O valor de F é obtido a partir da relação da *variabilidade entre* (S^2_E) com a *variabilidade dentro* (S^2_D): $F = S^2_E / S^2_D$. Se o F obtido for menor que o F crítico (obtido de uma tabela de distribuição F) pode-se aceitar a hipótese nula (H_0) como verdadeira. A hipótese nula na ANOVA é assumida como a inexistência de diferenças entre os tratamentos sob análise.

Além da análise de variância, a partir dos resultados obtidos, foi calculada a razão de mutagenicidade (RM) para cada dose analisada, que é a média do número de revertentes na placa teste dividido pela média do número de revertentes por placa do controle negativo (reversões espontâneas). As amostras foram consideradas com resultado positivo quando a razão de mutagenicidade (RM) foi maior ou igual a 2 em pelo menos uma das doses testadas e quando houve uma relação dose resposta entre as concentrações testadas e o número de revertentes induzidos. Por sua vez, a amostra foi considerada com resultado negativo para o teste de Ames, quando a mesma não induziu aumento significativo no número de revertentes e seus RM foram todos menores que 2.

Quando houve uma diferença estatisticamente significativa entre o grupo tratado e o controle negativo, mas a razão de mutagenicidade foi menor que 2, as amostras foram consideradas como causadoras de indícios de mutagenicidade. Isso significa dizer que a amostra apresenta em sua constituição compostos capazes de ocasionar danos ao DNA, mas nas condições empregadas, sua mutagenicidade não foi efetiva.

3.8.2 Teste do Micronúcleo

Após a análise citológica das lâminas contendo amostras do sangue periférico dos camundongos tratados com os extratos vegetais, foram calculadas as frequências médias de células micronucleadas, bem como os desvios padrão para cada um dos grupos de tratamento. A partir destes resultados foi aplicado um teste de Análise de Variância (ANOVA) seguido pelo teste-*t* de Student, realizando-se comparações entre os valores obtidos para os grupos tratados com os extratos vegetais e aqueles obtidos para o grupo controle-solvente. Quando houve uma diferença estatisticamente significativa em nível de 5% entre os grupos tratados com os extratos e seus respectivos controles, o composto testado foi considerado mutagênico. Os testes estatísticos foram realizados com o software estatístico INSTAT (GraphPad).

O teste-*t* é utilizado quando visa-se a comparação entre as médias obtidas de duas amostras, com variâncias iguais. Nesse teste a hipótese nula (H_0) considera que não existem diferenças estatísticas entre as amostras e a hipótese alternativa é que as médias apresentam diferenças entre si.

4. RESULTADOS

4.1 Resultados *in vitro* – Extratos polares, apolares e frações enriquecidas

4.1.1 Gênero *Alchornea*

No presente estudo, foram realizados ensaios de mutagenicidade com os extratos metanólico (polar) e clorofórmico (apolar) das espécies *A. castaneifolia*, *A. glandulosa* e *A. triplinervia*. No teste de Ames, os extratos clorofórmicos das três espécies não apresentaram qualquer efeito mutagênico, com ou sem ativação metabólica. Entretanto, foi observada citotoxicidade para a linhagem TA100, após ativação metabólica, na maior dose testada do extrato clorofórmico de *A. castaneifolia* (Tabela 1; Figura 17). Os extratos metanólicos de *A. castaneifolia* e *A. glandulosa* foram mutagênicos para a linhagem TA98 (-S9/+S9), sendo que o extrato de *A. glandulosa* alterou significativamente a frequência de revertentes nas outras linhagens (Tabela 2; Figura 20). No caso do extrato metanólico de *A. triplinervia*, houve mutagenicidade (+S9) nas linhagens TA98 e TA97a. Esse extrato foi também citotóxico nas duas maiores doses testadas na linhagem TA102 (Tabela 3; Figura 22).

TABELA 1. Atividade mutagênica expressa pela média do número de revertentes, desvio padrão e razão de mutagenicidade (valor entre parênteses) nas linhagens TA98, TA100, TA97a e TA102 de *S. typhimurium* expostas à várias doses dos extratos clorofórmico e metanólico de *A. castaneifolia*, com (+S9) ou sem (-S9) ativação metabólica.

Tratamento (mg/placa)	TA98		TA100		TA97a		TA102	
	- S9	+ S9	- S9	+ S9	- S9	+ S9	- S9	+ S9
CHCl₃								
DMSO	34,3 ± 2,5	29,3 ± 1,5	151,0 ± 6,1	97,7 ± 4,7	112,5 ± 7,8	156,0 ± 8,9	365,0 ± 12,7	255,0 ± 8,5
1,01	47,0 ± 8,7 (1,4)	29,0 ± 2,0 (0,9)	184,0 ± 25,2 (1,2)	111,7 ± 15,0 (1,1)	103,0 ± 5,7 (0,9)	156,3 ± 12,5 (1,0)	367,0 ± 5,7 (1,0)	270,0 ± 1,4 (1,1)
2,02	45,0 ± 2,0 (1,3)	29,7 ± 4,0 (1,0)	172,0 ± 25,1 (1,1)	109,3 ± 12,9 (1,1)	106,5 ± 7,8 (0,9)	176,3 ± 6,4 (1,1)	348,5 ± 6,4 (0,9)	290,5 ± 6,4 (1,1)
4,05	46,3 ± 2,1 (1,3)	28,0 ± 3,6 (0,9)	175,7 ± 26,6 (1,2)	109 ± 12,0 (1,1)	126,5 ± 4,9 (1,1)	170,3 ± 6,1 (1,1)	308,5 ± 14,8 (0,8)	288,0 ± 11,3 (1,1)
6,08	45,3 ± 5,5 (1,3)	27,7 ± 4,0 (0,9)	153,3 ± 19,8 (1,0)	101,7 ± 6,0 (1,0)	126,0 ± 14,1 (1,1)	166,0 ± 8,0 (1,1)	351,0 ± 11,3 (1,0)	295,0 ± 8,5 (1,2)
8,10	42,0 ± 6,2 (1,2)	29,0 ± 2,0 (1,0)	164,3 ± 10,5 (1,1)	Citotóxico	120,5 ± 3,5 (1,1)	186,0 ± 10,4 (1,2)	328,0 ± 11,3 (0,9)	290,0 ± 9,9 (1,1)
MeOH								
DMSO	34,33 ± 2,5	26,7 ± 1,5	134,33 ± 10,6	87,33 ± 5,51	167,7 ± 11,9	112,5 ± 7,8	301,0 ± 8,5	212,0 ± 10,1
3,63	44,3 ± 7,2 (1,3)	39,7 ± 6,1 (1,5)	163,3 ± 12,2 (1,2)	117,3 ± 16,0 (1,3)	206,3 ± 15,6 (1,2)	119,3 ± 18,3 (1,1)	322,3 ± 21,6 (1,1)	221,6 ± 29,3 (1,0)
7,26	48,3 ± 4,6 (1,4)	51,3 ± 4,8 (1,9)*	177,6 ± 11,5 (1,3)	122,6 ± 12,3 (1,4)	197,0 ± 21,3 (1,2)	112,3 ± 12,7 (1,0)	317,6 ± 19,3 (1,0)	242,3 ± 15,4 (1,1)
14,52	58,3 ± 5,2 (1,7)*	63,3 ± 9,3 (2,4)*	168,3 ± 11,1 (1,2)	113,3 ± 7,4 (1,3)	212,6 ± 11,4 (1,3)	143,0 ± 11,9 (1,3)	327,6 ± 37,1 (1,1)	233,6 ± 29,4 (1,1)
21,78	68,6 ± 3,5 (2,0)*	69,3 ± 9,1 (2,6)*	187,3 ± 9,5 (1,4)	121,6 ± 15,1 (1,4)	207,3 ± 17,8 (1,2)	129,6 ± 13,1 (1,1)	322,3 ± 33,7 (1,1)	219,3 ± 31,1 (1,0)
29,04	71,3 ± 7,3 (2,1)*	64,3 ± 9,3 (2,4)*	194,6 ± 23,4 (1,4)	119,3 ± 15,9 (1,4)	218,6 ± 19,3 (1,3)	137,4 ± 17,1 (1,2)	344,3 ± 37,4 (1,1)	235,6 ± 23,6 (1,1)
Ctrol +	851,7 ± 66,3 ^a	1214,3 ± 93,3 ^b	1211,9 ± 112,6 ^c	1561,3 ± 121,1 ^b	1391,1 ± 134,3 ^a	1476,1 ± 138,6 ^b	1976,6 ± 159,2 ^d	1799,6 ± 154,1 ^b

DMSO: 100 µL/placa (controle negativo). Ctrol + (Controle Positivo): ^a NPD (4-nitro-*o*-phenilenediamina – 10,0 µg/placa); ^b 2-Anthramina (1,25 µg/placa); ^c Azida Sódica (1,25 µg/placa); ^d Daunomicina (3,0 µg/placa). * P ≤ 0,01.

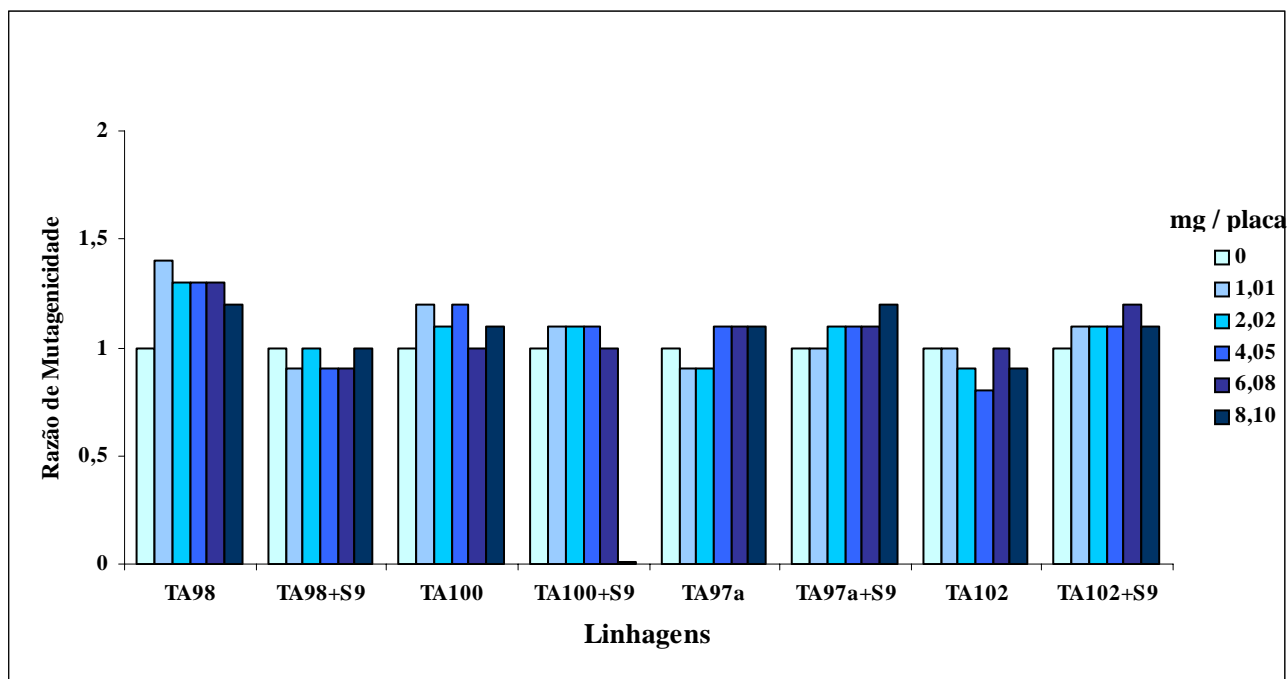


Figura 17. Valores de RM (razão de mutagenicidade) para as diferentes linhagens de *S. typhimurium*, após tratamento com extrato clorofórmico (CHCl_3) das folhas de *A. castaneifolia*, com e sem ativação metabólica (S9).

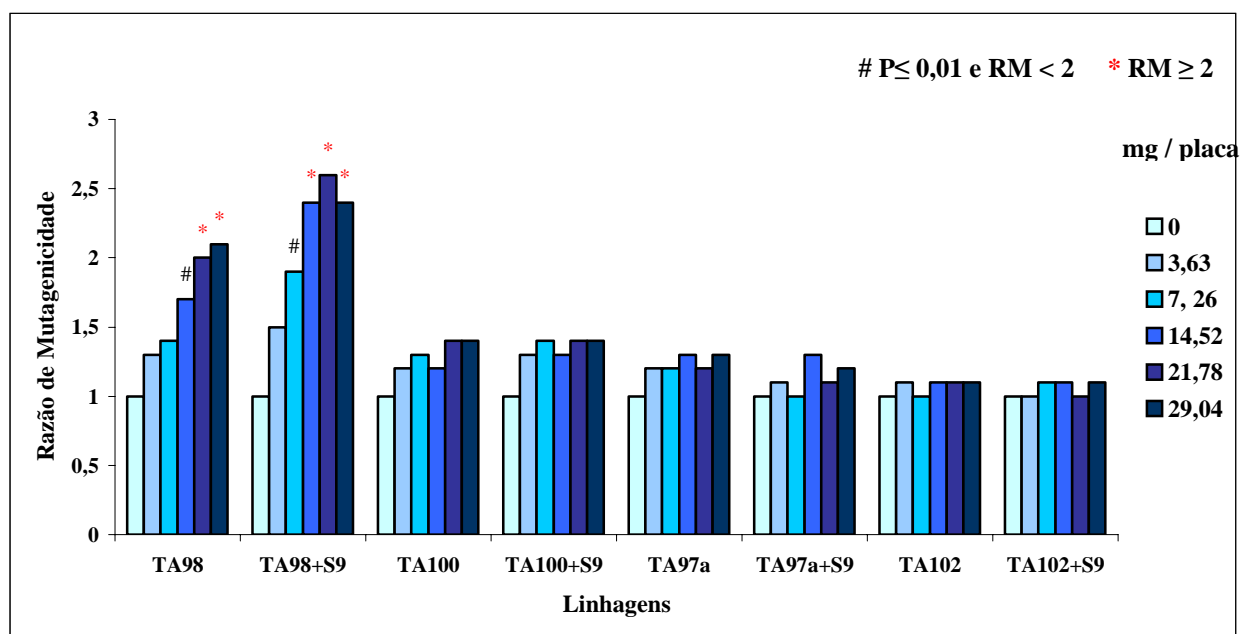


Figura 18. Valores de RM (razão de mutagenicidade) para as diferentes linhagens de *S. typhimurium*, após tratamento com extrato metanólico (MeOH) das folhas de *A. castaneifolia*, com e sem ativação metabólica (S9).

TABELA 2. Atividade mutagênica expressa pela média do número de revertentes, desvio padrão e razão de mutagenicidade (valor entre parênteses) nas linhagens TA98, TA100, TA97a e TA102 de *S. typhimurium* expostas à várias doses dos extratos clorofórmico e metanólico de *A. glandulosa*, com (+S9) ou sem (-S9) ativação metabólica.

Tratamento (mg/placa)	TA98		TA100		TA97a		TA102	
	- S9	+ S9	- S9	+ S9	- S9	+ S9	- S9	+ S9
CHCl₃								
DMSO	34,33 ± 2,5	26,7 ± 1,5	134,33 ± 10,6	87,33 ± 5,51	167,7 ± 11,9	112,5 ± 7,8	301,0 ± 8,5	212,0 ± 10,1
1,74	36,0 ± 1,7 (1,0)	26,7 ± 7,6 (1,0)	189,0 ± 24,5 (1,4)	116,3 ± 10,0 (1,3)	168,0 ± 12,3 (1,0)	135,0 ± 18,3 (1,2)	279,3 ± 14,6 (0,9)	223,3 ± 4,0 (1,0)
3,47	41,0 ± 5,0 (1,2)	25,3 ± 4,7 (0,9)	171,0 ± 10,5 (1,3)	117,3 ± 5,0 (1,3)	164,3 ± 6,1 (1,0)	140,0 ± 12,1 (1,2)	287,3 ± 13,5 (0,9)	224,3 ± 6,0 (1,0)
6,95	42,0 ± 5,2 (1,2)	23,0 ± 1,0 (0,9)	157,0 ± 11,5 (1,2)	102,7 ± 4,5 (1,8)*	161,3 ± 16,1 (1,0)	136,7 ± 11,6 (1,2)	298,0 ± 16,5 (1,0)	235,7 ± 4,0 (1,1)
10,42	42,0 ± 4,36 (1,2)	23,3 ± 4,0 (0,9)	184,7 ± 11,0 (1,4)	99,3 ± 5,51 (1,4)	154,7 ± 14,6 (0,9)	134,7 ± 6,5 (1,2)	290,3 ± 15,1 (1,0)	229,3 ± 7,5 (1,1)
13,90	44,33 ± 3,51 (1,3)	25,7 ± 4,2 (0,9)	174,3 ± 7,5 (1,3)	100,5 ± 3,54 (1,5)*	170,7 ± 12,3 (1,0)	118,0 ± 9,5 (1,0)	288,3 ± 17,5 (0,9)	245,0 ± 6,5 (1,1)
MeOH								
DMSO	34,33 ± 2,5	26,7 ± 1,5	134,33 ± 10,6	87,33 ± 5,51	167,7 ± 11,9	112,5 ± 7,8	301,0 ± 8,5	212,0 ± 10,1
2,83	47,7 ± 16,8 (1,4)	43,7 ± 6,7 (1,6)*	181,7 ± 14,8 (1,3)	131,3 ± 6,0 (1,5)*	234,0 ± 13,7 (1,4)	135,0 ± 8,7 (1,2)	392,0 ± 16,5 (1,3)	255,0 ± 27,9 (1,2)
5,67	54,0 ± 2,6 (1,6)*	56,0 ± 4,3 (2,1)*	200,7 ± 13,6 (1,5)*	142,7 ± 13,0 (1,6)*	318,3 ± 22,3 (1,9)*	172,0 ± 8,7 (1,5)*	458,0 ± 16,1 (1,5)*	284,7 ± 5,5 (1,3)
11,35	62,7 ± 2,1 (1,8)*	71,3 ± 8,7 (2,7)*	192,7 ± 16,0 (1,4)*	166,0 ± 9,85 (1,9)*	314,3 ± 16,3 (1,9)*	185,3 ± 10,4 (1,6)*	448,3 ± 33,9 (1,5)*	314,3 ± 16,1 (1,5)*
17,02	67,3 ± 5,5 (1,9)*	66,3 ± 9,1 (2,5)*	199,0 ± 17,8 (1,5)*	155,0 ± 12,5 (1,8)*	305,0 ± 31,7 (1,8)*	195,3 ± 8,1 (1,7)*	520,3 ± 68,3 (1,7)*	349,0 ± 8,2 (1,6)*
22,70	68,7 ± 2,31 (2,0)*	66,3 ± 9,3 (2,5)*	226,0 ± 33,3 (1,7)*	137,0 ± 5,57 (1,6)*	331,3 ± 12,7 (1,9)*	205,3 ± 7,1 (1,8)*	460,7 ± 24,3 (1,5)*	352,3 ± 5,5 (1,7)*
Ctrol +	896,7 ± 26,3 ^a	1194,3 ± 113,3 ^b	1413,7 ± 97,6 ^c	1644,9 ± 165,1 ^b	1411,7 ± 110,9 ^a	1276,7 ± 126,9 ^b	1816,3 ± 182,2 ^d	2031,3 ± 241,1 ^b

DMSO: 100 µL/placa (controle negativo). Ctrol + (Controle Positivo): ^aNPD (4-nitro-*o*-phenilenediamina – 10,0 µg/placa); ^b 2-Antramina (1,25

µg/placa); ^c Azida Sódica (1,25 µg/placa); ^d Daunomicina (3,0 µg/placa). CHCl₃ – Extrato Clorofórmico; MeOH – Extrato Metanólico. * P < 0,01.

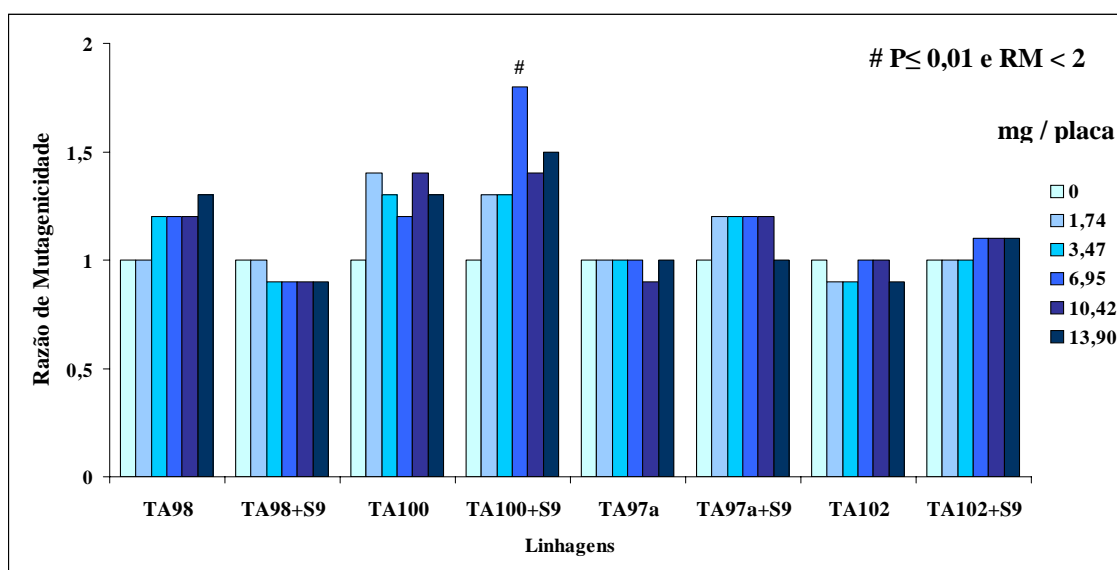


Figura 19. Valores de RM (razão de mutagenicidade) para as diferentes linhagens de *S. typhimurium*, após tratamento com extrato clorofórmico (CHCl_3) das folhas de *A. glandulosa*, com e sem ativação metabólica (S9).

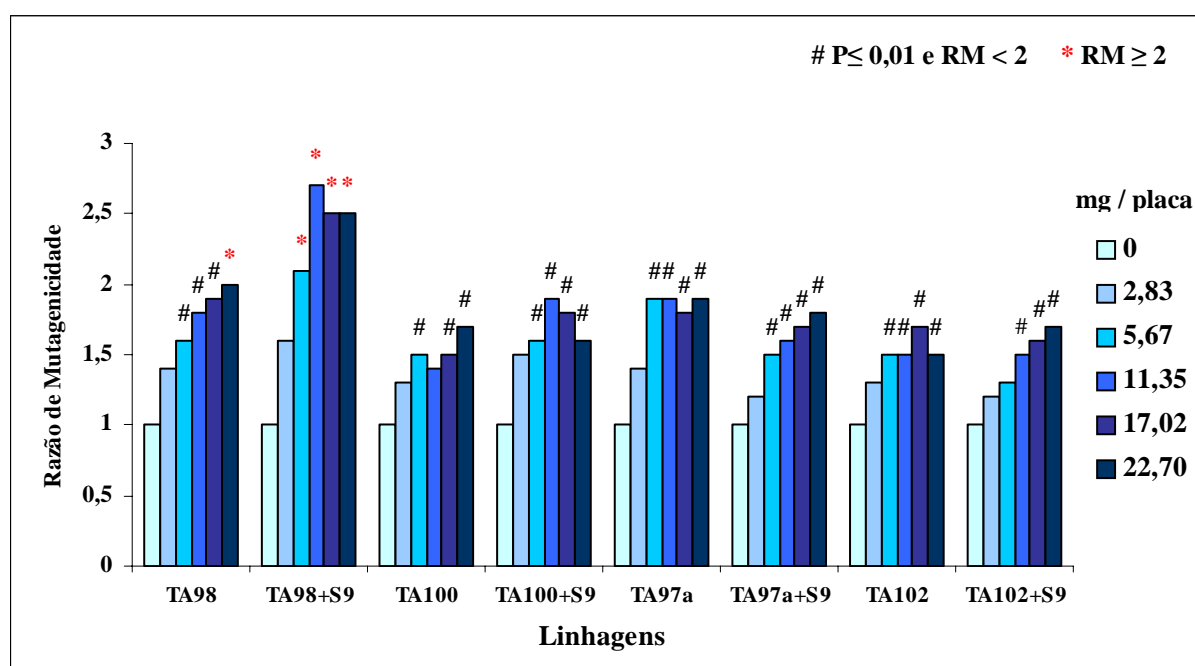


Figura 20. Valores de RM (razão de mutagenicidade) para as diferentes linhagens de *S. typhimurium*, após tratamento com extrato metanólico (MeOH) das folhas de *A. glandulosa*, com e sem ativação metabólica (S9).

TABELA 3. Atividade mutagênica expressa pela média do número de revertentes, desvio padrão e razão de mutagenicidade (valor entre parênteses) nas linhagens TA98, TA100, TA97a e TA102 de *S. typhimurium* expostas à várias doses dos extratos clorofórmico e metanólico de *A. triplinervia*, com (+S9) ou sem (-S9) ativação metabólica.

Tratamento (mg/placa)	TA98		TA100		TA97a		TA102	
	- S9	+ S9	- S9	+ S9	- S9	+ S9	- S9	+ S9
CHCl₃								
DMSO	34,33 ± 2,52	15,3 ± 2,5	106,3 ± 19,5	133,3 ± 16,6	112,5 ± 7,8	148,0 ± 14,1	365,0 ± 12,7	252,0 ± 8,5
2,1	48,0 ± 9,64 (1,4)	19,7 ± 3,1 (1,3)	117,3 ± 8,5 (1,1)	162,0 ± 17,6 (1,2)	102,0 ± 1,4 (0,9)	160,5 ± 3,5 (1,1)	358,0 ± 12,7 (1,2)	273,7 ± 13,6 (1,1)
4,1	43,7 ± 6,0 (1,3)	19,3 ± 7,0 (1,3)	123,3 ± 9,3 (1,2)	151,0 ± 11,1 (1,1)	114,0 ± 8,5 (1,0)	158,5 ± 26,2 (1,1)	335,0 ± 18,4 (1,1)	272,7 ± 13,9 (1,1)
8,3	46,7 ± 4,5 (1,4)	15,7 ± 2,5 (1,0)	119,0 ± 12,1 (1,1)	155,3 ± 9,3 (1,2)	140,5 ± 18,8 (1,3)	145,0 ± 11,3 (1,0)	370,0 ± 15,6 (1,2)	273,3 ± 22,4 (1,1)
12,4	45,0 ± 3,0 (1,3)	15,3 ± 3,1 (1,0)	133,0 ± 6,5 (1,2)	155,0 ± 8,5 (1,2)	141,5 ± 16,3 (1,3)	144,5 ± 23,3 (1,0)	331,0 ± 31,1 (1,1)	303,0 ± 15,1 (1,2)
16,6	49,7 ± 2,5 (1,4)	18,7 ± 2,3 (1,2)	134,0 ± 8,2 (1,3)	115,7 ± 3,1 (0,9)	138,0 ± 4,2 (1,2)	141,5 ± 3,5 (1,0)	377,0 ± 8,5 (1,2)	295,3 ± 15,2 (1,2)
MeOH								
DMSO	37,0 ± 3,61	15,3 ± 2,5	106,3 ± 19,5	133,3 ± 16,6	112,5 ± 7,8	148,0 ± 14,1	301,0 ± 8,5	252,0 ± 8,5
3,1	51,0 ± 17,5 (1,4)	33,7 ± 4,0 (2,2)*	120,3 ± 20,1 (1,1)	177 ± 17,0 (1,3)	154,0 ± 22,6 (1,4)	364,5 ± 14,8(2,5)*	382,0 ± 19,5 (1,3)	258,7 ± 18,1 (1,0)
6,2	61,0 ± 10,0 (1,6)*	41,3 ± 3,0 (2,7)*	119,7 ± 7,0 (1,1)	183,0 ± 10,5 (1,4)	143,0 ± 28,3 (1,3)	461,0 ± 2,8 (3,1)*	375,3 ± 7,8 (1,2)	260,0 ± 16,8 (1,0)
12,5	61,3 ± 1,53 (1,7)*	45,0 ± 9,2 (2,9)*	129,7 ± 8,3 (1,2)	178,7 ± 17,5 (1,3)	110,5 ± 3,5 (1,0)	378,5 ± 12,0(2,6)*	272,3 ± 9,7 (0,9)	289,0 ± 9,2 (1,1)
18,7	64,7 ± 24,7 (1,7)*	46,0 ± 4,4 (3,0)*	124,7 ± 10,7 (1,2)	187,3 ± 11,5 (1,4)	104,0 ± 9,9 (0,9)	270,0 ± 26,9(1,8)*	Citotóxico	299,7 ± 16,0 (1,2)
25,0	62,0 ± 14,73(1,7)*	39,0 ± 9,6 (2,5)*	133,7 ± 4,1 (1,3)	166,0 ± 15,4 (1,2)	108,5 ± 6,4 (0,9)	108,5 ± 10,6 (0,7)	Citotóxico	316,7 ± 16,9 (1,3)
Ctrol +	1021,3 ± 96,3 ^a	1114,3 ± 133,3 ^b	1643,9 ± 112,6 ^c	1534,6 ± 198,9 ^b	1531,8 ± 165,9 ^a	1316,7 ± 131,9 ^b	1766,3 ± 131,2 ^d	1981,3 ± 179,1 ^b

DMSO: 100 µL/placa (controle negativo). Ctrol + (Controle Positivo): ^aNPD (4-nitro-*o*-phenilenediamina – 10,0 µg/placa); ^b 2-Antramina (1,25 µg/placa); ^c Azida Sódica (1,25 µg/placa); ^d Daunomicina (3,0 µg/placa). CHCl₃ – Extrato Clorofórmico; MeOH – Extrato Metanólico. * P ≤ 0,01.

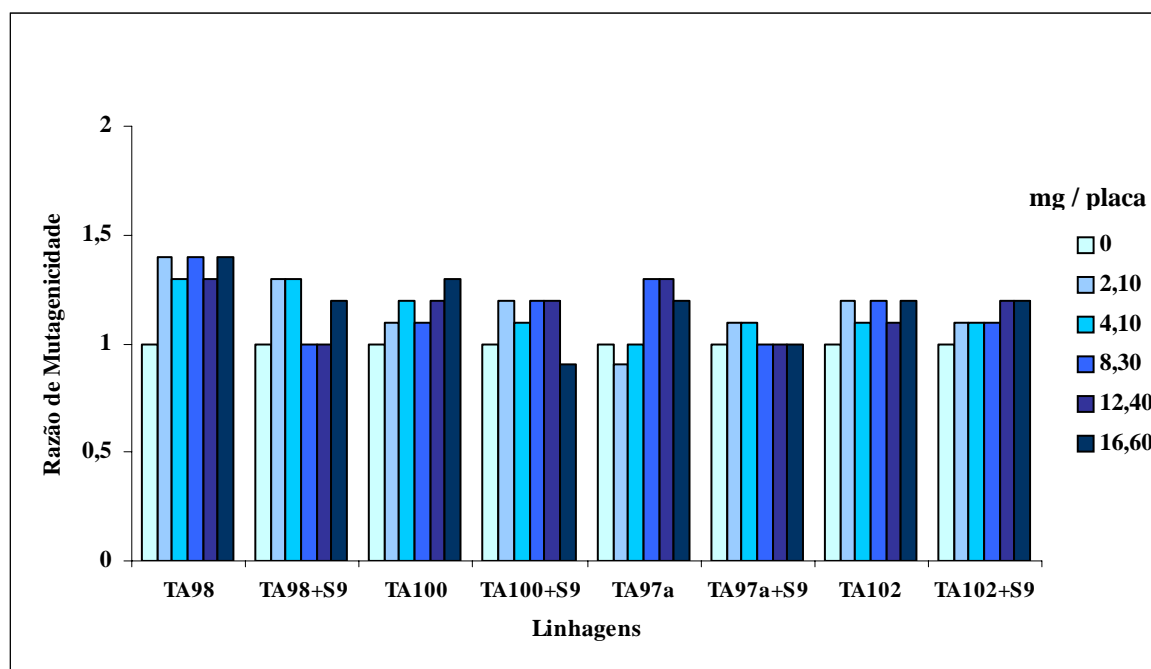


Figura 21. Valores de RM (razão de mutagenicidade) para as diferentes linhagens de *S. typhimurium*, após tratamento com extrato clorofórmico (CHCl_3) das folhas de *A. triplinervia*, com e sem ativação metabólica (S9).

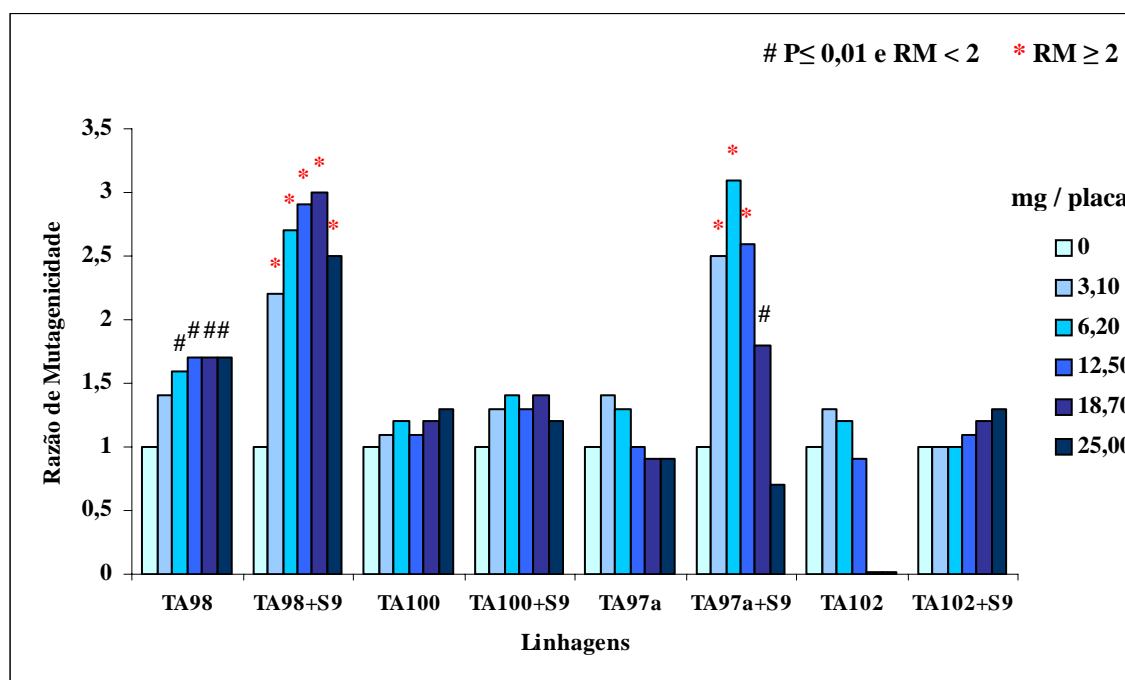


Figura 22. Valores de RM (razão de mutagenicidade) para as diferentes linhagens de *S. typhimurium*, após tratamento com extrato metanólico (MeOH) das folhas de *A. triplinervia*, com e sem ativação metabólica (S9).

4.1.2 *Anacardium humile*

Foram analisados os extratos metanólico (polar) e diclorometânico (apolar) desta espécie vegetal e, em nenhuma das condições empregadas, eles se mostraram mutagênicos. Entretanto, nas linhagens TA100 e TA97a, sem ativação metabólica, o extrato metanólico apresentou citotoxicidade nas maiores doses avaliadas (Tabela 4; Figura 24).

TABELA 4. Atividade mutagênica expressa pela média do número de revertentes, desvio padrão e razão de mutagenicidade (valor entre parênteses) nas linhagens TA98, TA100, TA97a e TA102 de *S. typhimurium* expostas à várias doses dos extratos diclorometânico e metanólico de *A. humile*, com (+S9) ou sem (-S9) ativação metabólica.

Tratamento (mg/placa)	TA98		TA100		TA97a		TA102	
	- S9	+ S9	- S9	+ S9	- S9	+ S9	- S9	+ S9
CH₂Cl₂								
DMSO	20,33 ± 4,04	15,3 ± 2,5	94,3 ± 3,5	133,3 ± 16,6	112,5 ± 7,8	144,3 ± 9,1	291,3 ± 6,7	274,7 ± 12,9
1,64	21,3 ± 4,16 (1,0)	23,7 ± 4,2 (1,5) [*]	82,0 ± 5,0 (0,9)	139,0 ± 7,0 (1,0)	110,0 ± 5,7 (0,9)	163,3 ± 22,9 (1,1)	263,3 ± 25,5 (0,9)	313,0 ± 13,5 (1,1)
3,27	23,0 ± 2,0 (1,1)	19,3 ± 3,2 (1,3)	85,0 ± 2,6 (0,9)	144,0 ± 12,7 (1,1)	117,5 ± 7,8 (1,0)	152,7 ± 4,2 (1,1)	257,0 ± 12,0 (0,9)	315,3 ± 20,0 (1,1)
6,55	20,0 ± 1,0 (1,0)	20,0 ± 1,0 (1,3)	92,7 ± 7,4 (1,0)	141,0 ± 17,4 (1,0)	110,0 ± 8,5 (0,9)	161,7 ± 14,6 (1,1)	196,3 ± 54,9 (0,7)	332,3 ± 11,0 (1,2)
9,82	22,3 ± 4,04 (1,1)	18,7 ± 2,5 (1,2)	117,7 ± 8,0 (1,2)	153,7 ± 8,3 (1,1)	121,0 ± 2,8 (1,1)	157,7 ± 9,6 (1,1)	217,7 ± 16,0 (0,7)	325,7 ± 10,4 (1,2)
13,10	17,0 ± 3,61 (0,8)	19,7 ± 6,7 (1,3)	108,3 ± 4,0 (1,1)	143,7 ± 7,1 (1,1)	133,0 ± 4,2 (1,2)	151,3 ± 11,2 (1,1)	231,3 ± 4,9 (0,8)	315,0 ± 12,5 (1,1)
MeOH								
DMSO	20,33 ± 4,04	15,3 ± 2,5	121,7 ± 14,5	133,3 ± 16,6	112,5 ± 7,8	144,3 ± 9,1	291,3 ± 6,7	274,7 ± 12,9
2,22	19,0 ± 4,58 (0,9)	16,0 ± 1,0 (1,0)	112,0 ± 15,7 (0,9)	144,7 ± 10,7 (1,1)	119,5 ± 4,9 (1,1)	153,7 ± 12,7 (1,1)	263,3 ± 25,5 (0,9)	282,0 ± 12,3 (1,0)
4,45	20,0 ± 1,41 (1,0)	16,0 ± 2,8 (1,0)	96,7 ± 7,5 (0,8)	134,0 ± 1,4 (1,0)	106,5 ± 3,5 (0,9)	166,5 ± 14,8 (1,1)	257,0 ± 17,0 (0,9)	319,5 ± 6,4 (1,2)
8,90	20,0 ± 3,61 (1,0)	16,7 ± 1,5 (1,1)	98,3 ± 6,4 (0,8)	134,7 ± 8,7 (1,0)	98,0 ± 1,4 (0,9)	175,7 ± 6,1 (1,2)	229,7 ± 14,7 (0,8)	327,3 ± 12,7 (1,2)
13,35	17,5 ± 3,54 (0,9)	15,5 ± 0,7 (1,0)	77,5 ± 3,5 (0,6)	128,0 ± 11,3 (1,0)	Citotóxico	156,5 ± 16,2 (1,1)	217,0 ± 22,6 (0,7)	309,5 ± 16,3 (1,1)
17,80	20,7 ± 6,43 (1,0)	18,0 ± 3,6 (1,2)	Citotóxico	126,0 ± 9,5 (0,9)	Citotóxico	166,7 ± 5,9 (1,1)	231,3 ± 4,9 (0,8)	321,3 ± 11,9 (1,2)
Ctrl +	978,3 ± 66,3 ^a	1216,9 ± 121,3 ^b	1319,7 ± 121,6 ^c	1534,9 ± 165,1 ^b	1487,9 ± 110,9 ^a	1316,3 ± 118,9 ^b	1766,9 ± 143,2 ^d	2119,3 ± 231,1 ^b

DMSO: 100 µL/placa (controle negativo). Ctrl + (Controle Positivo): ^aNPD (4-nitro-*o*-phenilenediamina – 10,0 µg/placa); ^b2-Antramina (1,25 µg/placa); ^cAzida Sódica (1,25 µg/placa); ^dDaunomicina (3,0 µg/placa). CH₂Cl₂-Extrato Diclorometânico; MeOH-Extrato Metanólico. ^{*}P < 0,01

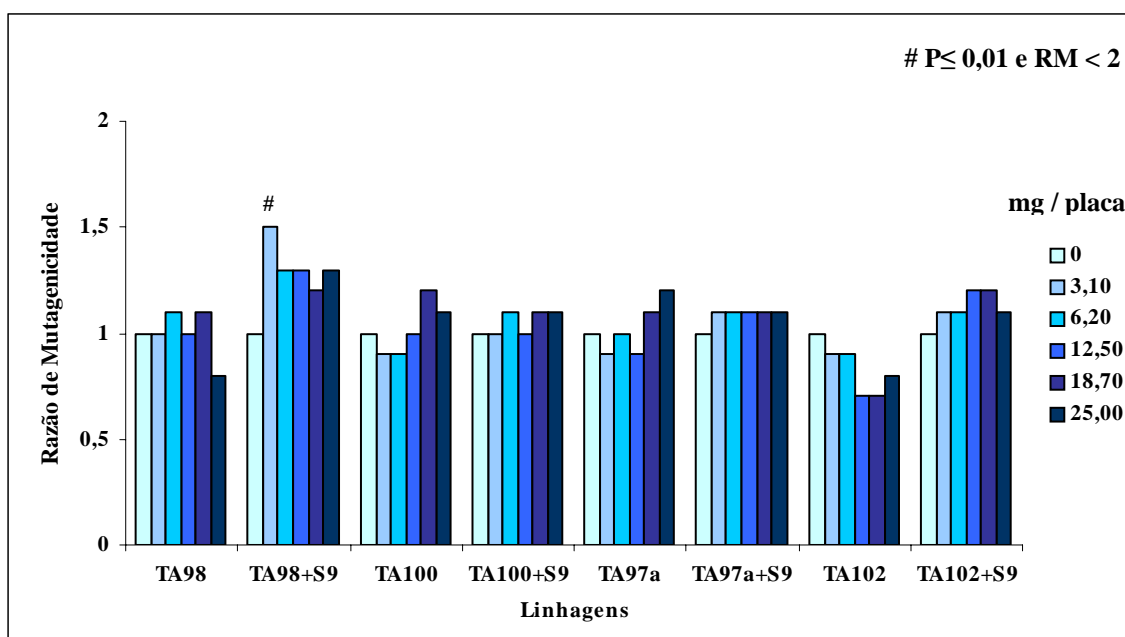


Figura 23. Valores de RM (razão de mutagenicidade) para as diferentes linhagens de *S. typhimurium*, após tratamento com extrato diclorometânico (DCM) das folhas de *A. humile*, com e sem ativação metabólica (S9).

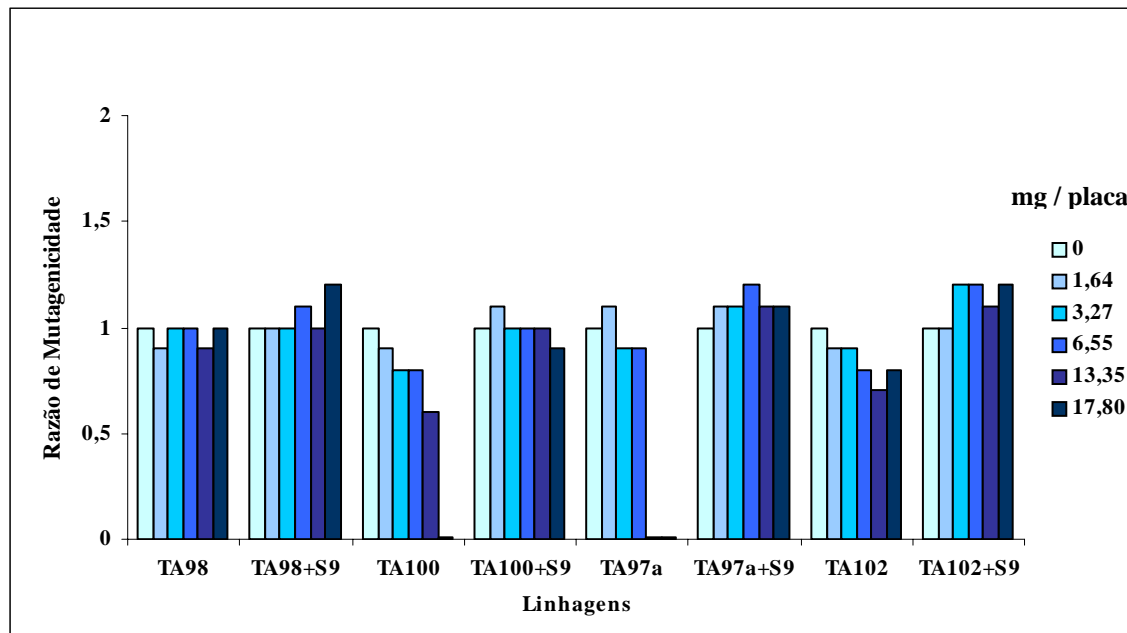


Figura 24. Valores de RM (razão de mutagenicidade) para as diferentes linhagens de *S. typhimurium*, após tratamento com extrato metanólico (MeOH) das folhas de *A. humile*, com e sem ativação metabólica (S9).

4.1.3 *Byrsonima basiloba*

Os extratos metanólico e clorofórmico da espécie *B. basiloba* foram avaliados através do teste de Ames e não apresentaram uma mutagenicidade bem caracterizada (Tabela 5; Figuras 25 e 26). Os resultados obtidos para o extrato clorofórmico desta espécie não demonstraram indução de mutações nas doses empregadas. Já o extrato metanólico apresentou um aumento significativo na frequência de revertentes na linhagem TA100 (-S9), mas a razão de mutagenicidade não foi maior do que 2, sendo verificados portanto apenas indícios de mutagenicidade. Nessa mesma linhagem, o extrato metanólico passou a ser citotóxico após a ativação metabólica, nas três maiores doses testadas. O extrato metanólico dessa espécie também foi citotóxico para a linhagem TA97a, mas apenas sem ativação metabólica; alterações estatísticas significativas foram observadas nessa cepa.

TABELA 5. Atividade mutagênica expressa pela média do número de revertentes, desvio padrão e razão de mutagenicidade (valor entre parênteses) nas linhagens TA98, TA100, TA97a e TA102 de *S. typhimurium* expostas à várias doses dos extratos clorofórmico e metanólico de *B. basiloba*, com (+S9) ou sem (-S9) ativação metabólica.

Tratamento (mg/placa)	TA98		TA100		TA97a		TA102	
	- S9	+ S9	- S9	+ S9	- S9	+ S9	- S9	+ S9
CHCl₃								
DMSO	37,0 ± 3,61	28,7 ± 4,5	106,3 ± 19,5	97,7 ± 4,7	112,5 ± 7,8	156,0 ± 11,5	291,3 ± 6,7	266,3 ± 31,6
1,99	43,7 ± 12,2 (1,2)	32,7 ± 3,5 (1,2)	119,3 ± 9,8 (1,1)	109,0 ± 10,5 (1,2)	120,0 ± 4,2 (1,1)	162,0 ± 8,9 (1,0)	248,0 ± 32,6 (0,8)	312,7 ± 10,4 (1,2)
3,97	36,3 ± 2,52 (1,0)	27,7 ± 3,5 (1,3)	123,3 ± 8,9 (1,2)	107,7 ± 16,6 (1,1)	133,0 ± 5,7 (1,2)	173,3 ± 10,7 (1,1)	274,3 ± 18,0 (0,9)	304,0 ± 21,0 (1,1)
7,95	41,0 ± 5,2 (1,1)	31,3 ± 7,5 (1,1)	130,0 ± 6,9 (1,2)	116,3 ± 24,6 (1,2)	126,5 ± 6,4 (1,1)	169,3 ± 20,0 (1,1)	201,7 ± 14,3 (0,7)	315,7 ± 18,5 (1,2)
11,92	34,7 ± 7,64 (0,9)	38,7 ± 2,5 (1,0)	126,3 ± 5,1 (1,2)	101,0 ± 13,1 (1,0)	138,0 ± 5,7 (1,2)	195,3 ± 24,7 (1,2)	232,0 ± 7,9 (0,8)	324,7 ± 22,2 (1,2)
15,90	36,7 ± 4,0 (1,0)	34,0 ± 3,6 (1,1)	126,7 ± 7,6 (1,2)	98,7 ± 4,2 (1,0)	154,0 ± 8,5 (1,4)	154,0 ± 10,5 (1,0)	214,0 ± 7,1 (0,7)	313,0 ± 13,5 (1,2)
MeOH								
DMSO	37,0 ± 3,61	28,7 ± 4,5	106,3 ± 19,5	97,7 ± 4,7	112,5 ± 7,8	156,0 ± 11,5	291,3 ± 6,7	266,3 ± 31,6
3,65	41,0 ± 5,2 (1,1)	32,7 ± 2,5 (1,1)	128,7 ± 7,6 (1,2)	92,3 ± 6,7 (0,9)	194,0 ± 1,4 (1,7)*	217,3 ± 20,0 (1,4)	293,7 ± 10,3 (1,0)	285,0 ± 12,8 (1,1)
7,30	28,3 ± 2,89 (0,8)	29,7 ± 4,0 (1,0)	122,0 ± 6,2 (1,5)*	104,7 ± 5,9 (1,1)	167,0 ± 5,7 (1,5)*	267,0 ± 10,9 (1,7)*	242,7 ± 11,1 (0,8)	293,0 ± 8,5 (1,1)
14,60	44,0 ± 19,2 (1,0)	30,7 ± 5,9 (1,1)	125,7 ± 12,9 (1,2)	Citotóxico	100,5 ± 4,9 (0,9)	255,0 ± 6,0 (1,6)*	233,7 ± 31,2 (0,8)	285,3 ± 39,3 (1,1)
21,90	39,0 ± 9,54 (1,0)	33,0 ± 3,6 (1,1)	177,0 ± 11,8 (1,7)*	Citotóxico	Citotóxico	138,7 ± 6,5 (0,9)	219,0 ± 28,3 (0,7)	292,3 ± 13,6 (1,1)
29,20	48,3 ± 3,06 (1,3)	33,0 ± 5,6 (1,1)	191,3 ± 26,0 (1,8)*	Citotóxico	Citotóxico	140,3 ± 8,6 (0,9)	224,3 ± 9,1 (0,8)	291,7 ± 21,6 (1,1)
Ctrl +	766,3 ± 76,3 ^a	1314,3 ± 143,1 ^b	1213,9 ± 107,8 ^c	1534,9 ± 176,1 ^b	1456,7 ± 122,9 ^a	1316,7 ± 197,9 ^b	1857,6 ± 121,2 ^d	1973,3 ± 231,1 ^b

DMSO: 100 µL/placa (controle negativo). Ctrl + (Controle Positivo): ^a NPD (4-nitro-*o*-phenilenediamina – 10,0 µg/placa); ^b 2-Antramina (1,25 µg/placa); ^c Azida Sódica (1,25 µg/placa); ^d Daunomicina (3,0 µg/placa). CHCl₃ – Extrato Clorofórmico; MeOH – Extrato Metanólico. * P < 0,01.

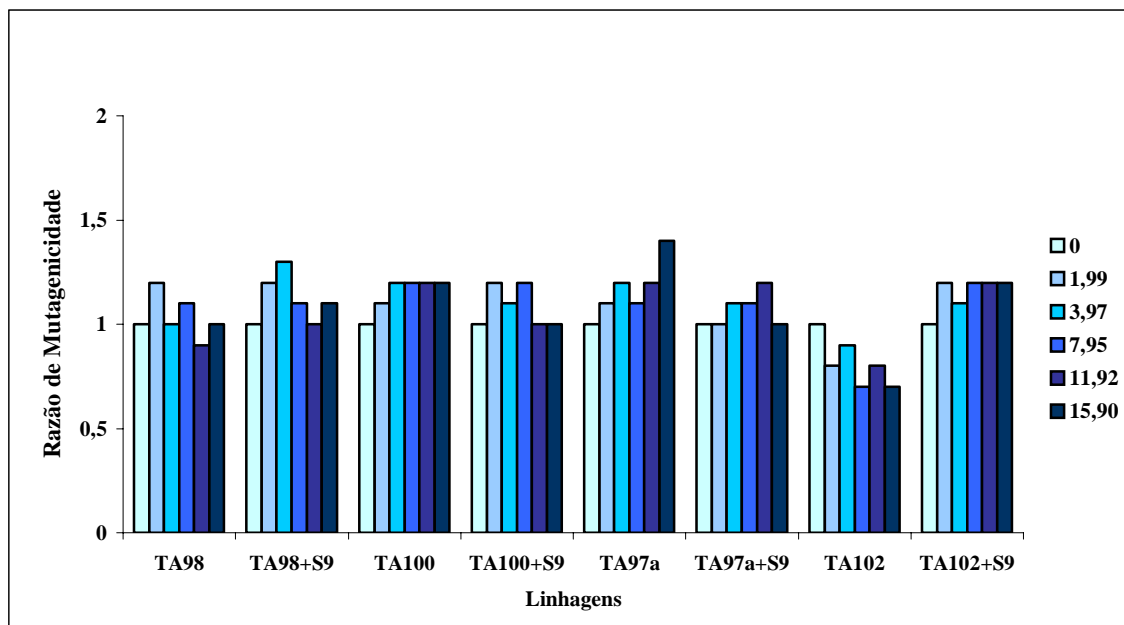


Figura 25. Valores de RM (razão de mutagenicidade) para as diferentes linhagens de *S. typhimurium*, após tratamento com extrato clorofórmico (CHCl_3) das folhas de *B. basiloba*, com e sem ativação metabólica (S9).

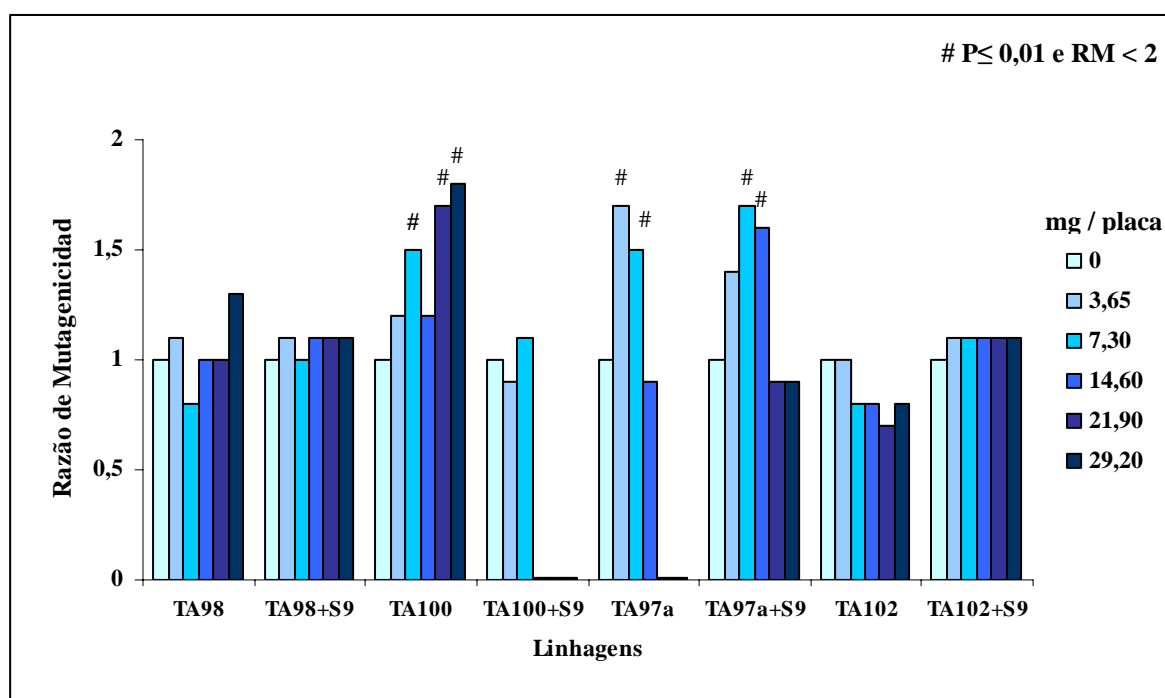


Figura 26. Valores de RM (razão de mutagenicidade) para as diferentes linhagens de *S. typhimurium*, após tratamento com extrato metanólico (MeOH) das folhas de *B. basiloba*, com e sem ativação metabólica (S9).

4.1.4 *Mouriri pusa*

Para avaliação da mutagenicidade *in vitro* da espécie *M. pusa* foram utilizadas cinco diferentes concentrações dos extratos metanólico e diclorometânico obtidos desta planta. O extrato diclorometânico não apresentou mutagenicidade em nenhuma das doses avaliadas (Tabela 6; Figura 27). A mesma tabela mostra que o extrato metanólico apresentou uma alta mutagenicidade, especialmente na linhagem TA98, onde a razão de mutagenicidade nas maiores doses ficou em torno de 7,0 (Figura 28). Nas linhagens TA100 e TA97a a mutagenicidade desse extrato também foi bastante evidente, com índices de mutagenicidade variando entre 2,1 e 4,2.

Além dos extratos vegetais já citados, foram avaliadas frações enriquecidas de flavonóides e taninos, obtidas desta espécie. A fração de flavonóides se mostrou bastante mutagênica (Tabela 7; Figura 29), especialmente na linhagem TA98 (-S9/+S9), onde a razão de mutagenicidade variou entre 2,3 e 12,2. A fração de taninos também foi mutagênica, porém as razões de mutagenicidade foram menores (Tabela 7, Figura 30)

TABELA 6. Atividade mutagênica expressa pela média do número de revertentes, desvio padrão e razão de mutagenicidade (valor entre parênteses) nas linhagens TA98, TA100, TA97a e TA102 de *S. typhimurium* expostas à várias doses dos extratos diclorometânico e metanólico de *M. pusa*, com (+S9) ou sem (-S9) ativação metabólica.

Tratamento (mg/placa)	TA98		TA100		TA97a		TA102	
	- S9	+ S9	- S9	+ S9	- S9	+ S9	- S9	+ S9
CH₂Cl₂								
DMSO	20,3 ± 4,0	26,7 ± 1,5 ³	106,3 ± 19,5	87,33 ± 5,5	167,7 ± 11,9	148,0 ± 14,1	301,0 ± 8,5	212,3 ± 10,6
1,72	20,7 ± 4,5 (1,0)	22,3 ± 3,5 (0,8)	116,0 ± 7,5 (1,1)	111,7 ± 3,1 (1,3)	235,3 ± 9,1 (1,4)	153,5 ± 13,4 (1,0)	274,3 ± 6,1 (0,9)	223,7 ± 6,7 (1,0)
3,45	15,3 ± 1,1 (0,7)	22,7 ± 3,5 (0,8)	125,0 ± 5,6 (1,2)	106,7 ± 7,5 (1,2)	234,3 ± 6,1 (1,4)	155,5 ± 7,8 (1,0)	274,3 ± 7,0 (0,9)	235,3 ± 6,0 (1,1)
6,90	18,0 ± 4,4 (0,9)	27,0 ± 7,5 (1,0)	121,0 ± 14,4 (1,1)	91,3 ± 12,7 (1,0)	165,0 ± 8,2 (0,9)	134,0 ± 8,5 (0,9)	270,3 ± 30,4 (0,9)	235,0 ± 3,6 (1,1)
10,35	15,3 ± 2,5 (0,7)	23,7 ± 2,9 (0,9)	130,3 ± 18,5 (1,2)	100,0 ± 3,61 (1,1)	212,0 ± 13,0 (1,2)	155,5 ± 6,4 (1,0)	276,3 ± 12,7 (0,9)	237,7 ± 5,9 (1,1)
13,80	15,3 ± 3,1 (0,7)	23,3 ± 4,0 (0,9)	152,3 ± 18,7 (1,4)	135,5 ± 20,5 (1,6) [*]	204,7 ± 22,9 (1,2)	159,5 ± 9,2 (1,1)	290,0 ± 17,7 (0,9)	232,3 ± 3,5 (1,1)
MeOH								
DMSO	20,3±4,0	26,7 ± 1,5	134,3 ± 10,6	87,3 ± 5,5	167,7 ± 11,9	148,0 ± 14,1	301 ± 8,5	212,3 ± 10,6
2,84	55,7 ± 8,1 (2,7) [*]	99,0 ± 9,8 (3,7) [*]	224,0 ± 8,7 (1,7) [*]	147,0 ± 5,6 (1,7) [*]	431,3 ± 28,3 (2,6) [*]	414,0 ± 43,8 (2,8) [*]	239,7 ± 65,7 (0,8)	247,3 ± 6,5 (1,2)
5,67	83,7 ± 17,2 (4,1) [*]	112,7 ± 8,33 (4,2) [*]	203,7 ± 10,7 (1,5) [*]	161,0 ± 5,6 (1,6) [*]	346,3 ± 94,9 (2,1) [*]	592,5 ± 34,6 (4,0) [*]	293,7 ± 9,4 (0,9)	244,3 ± 7,6 (1,1)
11,35	109,0 ± 12,1 (5,4) [*]	142,0 ± 3,61 (5,3) [*]	253,0 ± 11,0 (1,9) [*]	188,0 ± 8,0 (2,1) [*]	435,0 ± 23,1 (2,6) [*]	627,0 ± 36,8 (4,2) [*]	298,0 ± 11,4 (0,9)	263,7 ± 19,7 (1,2)
17,02	133,0 ± 19,1 (6,5) [*]	192,7 ± 12,1 (7,2) [*]	282,7 ± 13,0 (2,1) [*]	194,3 ± 31,8 (2,2) [*]	528,0 ± 9,5 (3,1) [*]	608,0 ± 21,2 (4,1) [*]	291,0 ± 2,0 (0,9)	247,0 ± 3,6 (1,2)
22,70	148,3 ± 10,4 (7,3) [*]	198,0 ± 15,9 (7,4) [*]	295,7 ± 12,2 (2,2) [*]	218,0 ± 16,0 (2,5) [*]	566,0 ± 19,5 (3,4) [*]	623,0 ± 36,7 (4,2) [*]	285,3 ± 19,1 (0,9)	245,3 ± 8,5 (1,5) [*]
Control +	767,3 ± 116,3 ^a	1215,3 ± 93,3 ^b	1431,7 ± 117,6 ^c	1714,9 ± 189,1 ^b	1311,7 ± 143,9 ^a	1546,7 ± 116,9 ^b	1656,3 ± 156,2 ^d	1931,3 ± 189,1 ^b

DMSO: 100 µL/placa (controle negativo). Contol + (Controle Positivo): ^a NPD (4-nitro-*o*-phenilenediamina – 10,0 µg/placa); ^b 2-Antramina (1,25 µg/placa); ^c Azida Sódica (1,25 µg/placa); ^d Daunomicina (3,0 µg/placa). CH₂Cl₂ – Extrato Diclorometânico; MeOH – Extrato Metanólico. ^{*} P < 0,01.

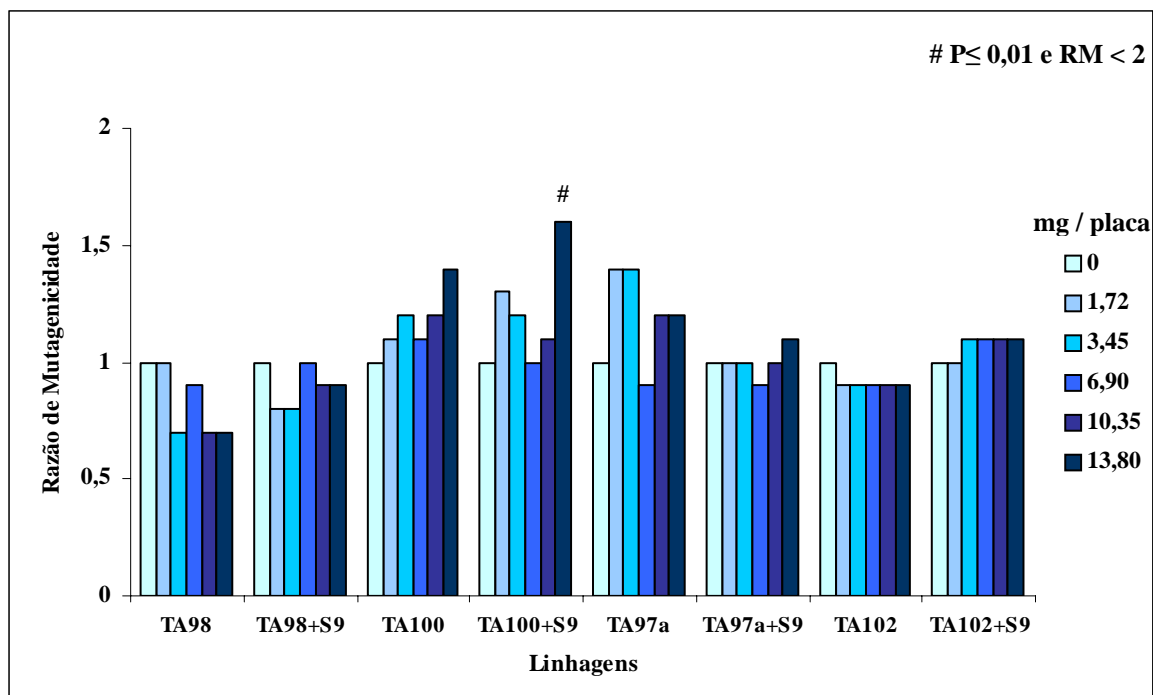


Figura 27. Valores de RM (razão de mutagenicidade) para as diferentes linhagens de *S. typhimurium*, após tratamento com extrato diclorometânico (DCM) das folhas de *M. pusa*, com e sem ativação metabólica (S9).

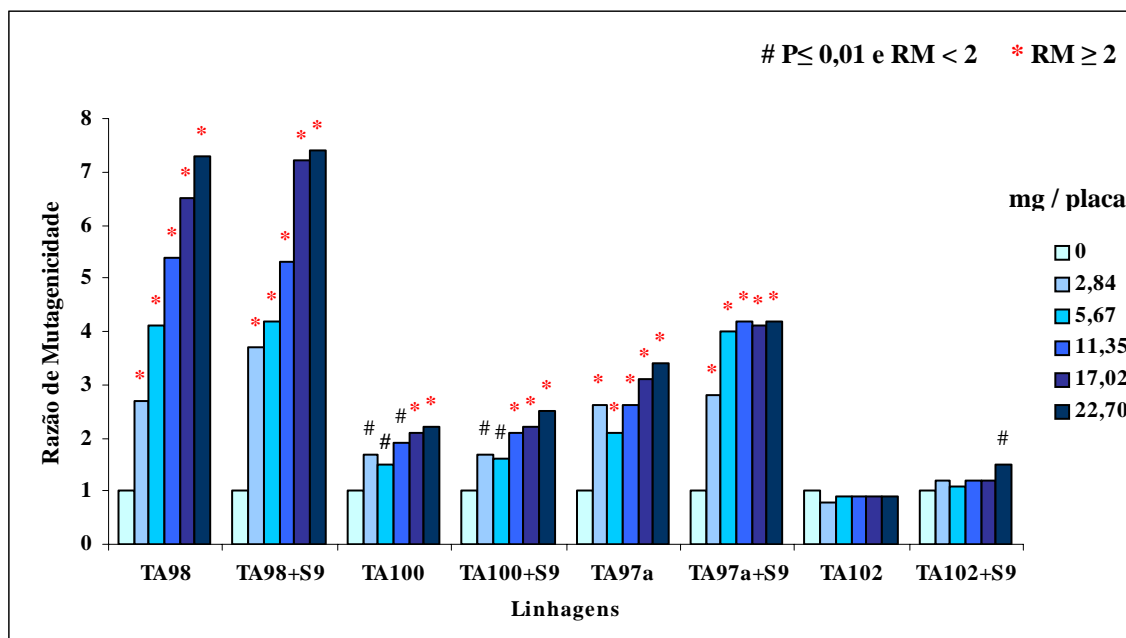


Figura 28. Valores de RM (razão de mutagenicidade) para as diferentes linhagens de *S. typhimurium*, após tratamento com extrato metanólico (MeOH) das folhas de *M. pusa*, com e sem ativação metabólica (S9).

TABELA 7. Atividade mutagênica expressa pela média do número de revertentes, desvio padrão e razão de mutagenicidade (valor entre parênteses) nas linhagens TA98 e TA100 de *S. typhimurium* expostas à várias doses das frações enriquecidas de flavonóides (FEF) e de taninos (FET), obtidas de *M. pusa*, com (+S9) ou sem (-S9) ativação metabólica.

Tratamento (mg / placa)	TA98		TA100	
	-S9	+S9	-S9	+S9
FEF				
DMSO	14,0 ± 1,4	18,5 ± 3,5	97,0 ± 1,4	81,5 ± 10,6
1,5	24,0 ± 5,6 (1,7) *	98,5 ± 3,5 (5,3) *	102,5 ± 6,4 (1,0)	161,5 ± 21,9 (2,0) *
3,0	32,0 ± 2,8 (2,3) *	118,0 ± 14,1 (6,4) *	103,0 ± 1,4 (1,1)	181,0 ± 9,9 (2,2) *
6,1	75,5 ± 9,2 (5,4) *	139,5 ± 9,2 (7,5) *	145,0 ± 4,2 (1,5) *	217,5 ± 7,8 (2,7) *
12,1	81,0 ± 2,8 (5,8) *	172,0 ± 8,5 (9,3) *	218,5 ± 14,8 (2,3) *	207,5 ± 2,1 (2,5) *
18,2	77,0 ± 1,4 (5,5) *	225,5 ± 9,2 (12,2) *	198,0 ± 5,7 (2,0) *	236,5 ± 6,4 (2,9) *
24,3	51,0 ± 7,1 (3,6) *	201,5 ± 6,4 (10,9) *	Citotóxico	179,0 ± 11,3 (2,2) *
FET				
DMSO	14,0 ± 1,4	18,5 ± 3,5	97,0 ± 1,4	81,5 ± 10,6
2,8	15,0 ± 4,2 (1,1)	36,0 ± 5,6 (1,9) *	87,0 ± 2,8 (0,9)	100,5 ± 2,1 (1,2)
5,6	15,5 ± 2,1 (1,1)	57,5 ± 7,8 (3,1) *	113,5 ± 17,6 (1,2)	137,0 ± 8,5 (1,7) *
11,2	17,5 ± 2,1 (1,2)	64,5 ± 7,8 (3,5) *	100,5 ± 3,5 (1,0)	130,0 ± 8,5 (1,6) *
22,4	22,0 ± 2,8 (1,6) *	58,0 ± 4,2 (3,1) *	120,0 ± 14,1 (1,2)	142,0 ± 15,5 (1,7) *
33,6	26,0 ± 4,2 (1,8) *	79,5 ± 10,6 (4,3) *	130,0 ± 8,5 (1,3)	130,5 ± 4,9 (1,6) *
44,8	32,5 ± 3,4 (2,3) *	74,5 ± 6,4 (4,0) *	131,5 ± 3,5 (1,3)	143,0 ± 5,6 (1,7) *
Control +	978,3 ± 48,9 ^a	1098,3 ± 114,1 ^b	1459 ± 112,1 ^c	1532,9 ± 123,7 ^b

DMSO: 100 µL/placa (controle negativo). Ctról + (Controle Positivo): ^a NPD (4-nitro-*o*-phenilenediamina – 10,0 µg/placa); ^b 2-Antramina (1,25 µg/placa); ^c Azida Sódica (1,25 µg/placa); * P < 0,01.

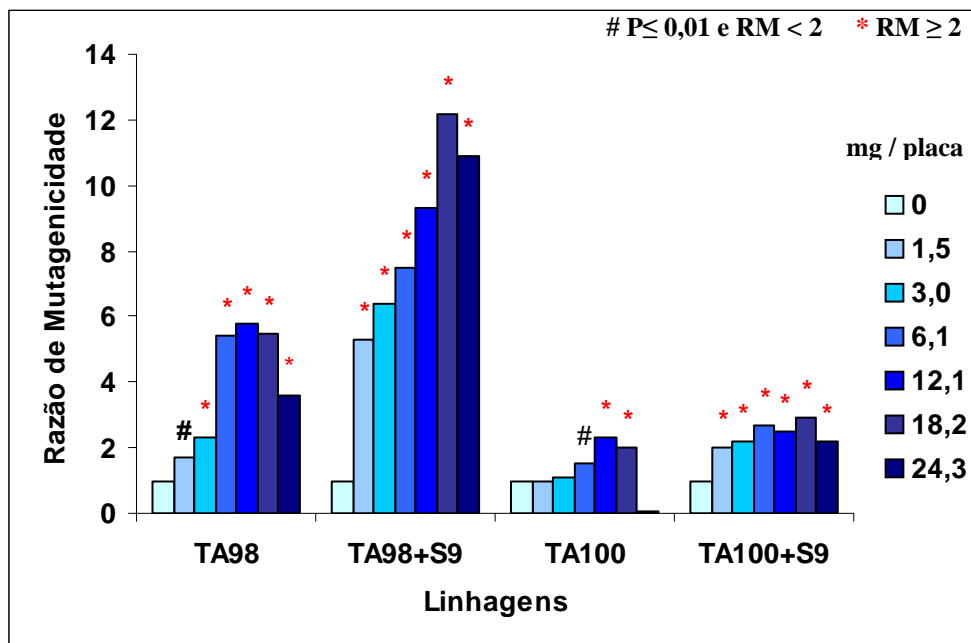


Figura 29. Valores de RM (razão de mutagenicidade) para diferentes linhagens de *S. typhimurium*, após tratamento com a Fração Enriquecida de Flavonóides, obtida do extrato metanólico das folhas de *M. pusa*, com e sem ativação metabólica (S9).

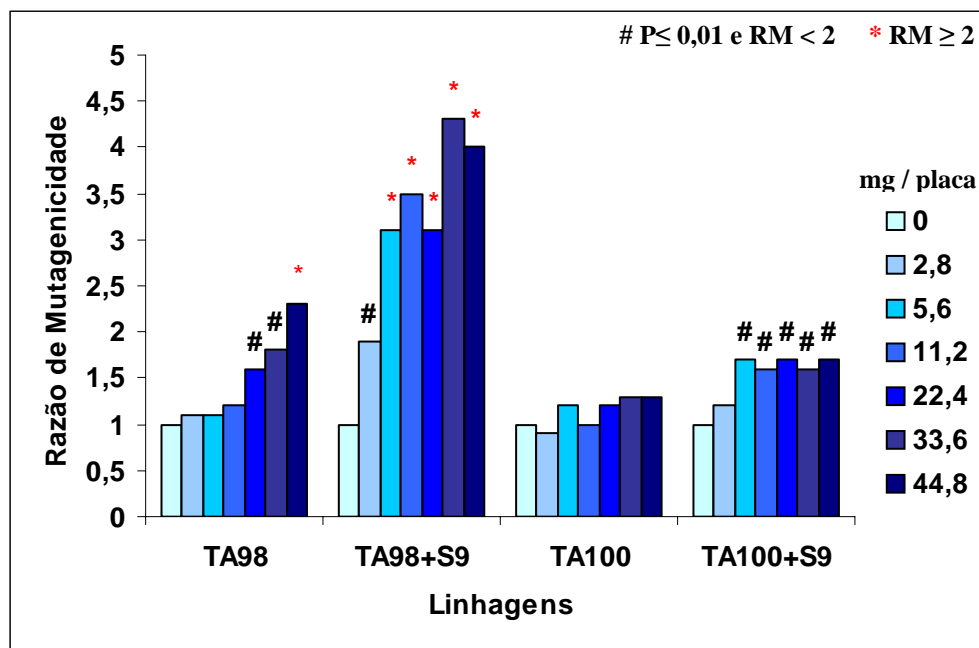


Figura 30. Valores de RM (razão de mutagenicidade) para diferentes linhagens de *S. typhimurium*, após tratamento com a Fração Enriquecida de Taninos, obtida do extrato metanólico das folhas de *M. pusa*, com e sem ativação metabólica (S9).

4.1.5 Gênero *Qualea*

Foram avaliadas três diferentes espécies do gênero *Qualea*: *Q. grandiflora*, *Q. multiflora* e *Q. parviflora*. Das três espécies foram avaliados, através do teste de Ames, os extratos metanólico e clorofórmico.

O extrato metanólico de *Q. grandiflora* (Tabela 8; Figura 32) aumentou a frequência de revertentes ($RM \geq 2$) apenas na linhagem TA100, sem ativação metabólica. Nas demais linhagens nenhuma alteração significativa foi induzida por este extrato. O extrato apolar de *Q. grandiflora* (Tabela 8; Figura 31) induziu mutações nas linhagens TA100 (sem S9), TA97a (-S9, +S9) e TA102 (com S9). Além disso, esse extrato foi citotóxico nas duas maiores concentrações avaliadas para as linhagens TA97a (-S9) e TA102 (-S9).

Quanto ao extrato metanólico da espécie *Q. multiflora* (Tabela 9; Figura 34), este se mostrou mutagênico na linhagem TA100, sem ativação metabólica e aumentou significativamente a frequência de revertentes na linhagem TA98. Neste último caso, entretanto, a razão de mutagenicidade não chegou a 2, não podendo ser caracterizada a atividade mutagênica. Já o extrato clorofórmico de *Q. multiflora* (Tabela 9; Figura 33) foi mutagênico para a linhagem TA100, com e sem ativação metabólica. Esse mesmo extrato também induziu um aumento significativo na frequência de revertentes na linhagem TA97a (-S9), porém a razão de mutagenicidade foi menor que 2.

O extrato metanólico de *Q. parviflora* não foi mutagênico em nenhuma das condições avaliadas. Porém, nas linhagens TA100 e TA102, esse extrato foi citotóxico (-S9) na maior dose utilizada (Tabela 10; Figura 36). O mesmo foi observado para o extrato clorofórmico (Tabela 10, Figura 35). Porém, este extrato foi citotóxico para a linhagem TA102, sem ativação metabólica, na maior dose testada.

TABELA 8. Atividade mutagênica expressa pela média do número de revertentes, desvio padrão e razão de mutagenicidade (valor entre parênteses) nas linhagens TA98, TA100, TA97a e TA102 de *S. typhimurium* expostas à várias doses dos extratos clorofórmico e metanólico de *Q. grandiflora*, com (+S9) ou sem (-S9) ativação metabólica.

Tratamento (mg/placa)	TA98		TA100		TA97a		TA102	
	- S9	+ S9	- S9	+ S9	- S9	+ S9	- S9	+ S9
CHCl₃								
DMSO	37,0 ± 3,6	15,3 ± 2,5	94,3 ± 3,5	133,3 ± 16,6	130,0 ± 12,3	233,0 ± 14,2	291,3 ± 6,7	272,7 ± 6,7
1,92	54,3 ± 3,1 (1,5) [*]	18,7 ± 2,1 (1,2)	110,3 ± 4,5 (1,2)	175,0 ± 7,0 (1,3)	264,0 ± 12,5 (2,0) [*]	468,7 ± 13,6 (2,0) [*]	485,0 ± 26,1 (1,7) [*]	481,7 ± 44,2 (1,8) [*]
3,85	48,3 ± 4,9 (1,3)	21,7 ± 3,1 (1,4)	130,7 ± 3,5 (1,4)	178,7 ± 14,6 (1,3)	228,3 ± 3,1 (1,8) [*]	476,3 ± 21,1 (2,0) [*]	385,3 ± 43,7 (1,3)	558,0 ± 40,3 (2,0) [*]
7,70	53,7 ± 12,7 (1,4)	16,7 ± 2,5 (1,1)	153,0 ± 5,0 (1,6) [*]	189,3 ± 3,2 (1,4)	105,3 ± 6,1 (0,8)	466,7 ± 10,0 (2,0) [*]	273,0 ± 67,7 (0,9)	562,3 ± 29,4 (2,1) [*]
11,55	49,7 ± 7,6 (1,3)	20,7 ± 4,7 (1,3)	223,0 ± 8,0 (2,4) [*]	149,3 ± 22,3 (1,1)	Citotóxico	369,3 ± 17,8 (1,6) [*]	Citotóxico	602,3 ± 4,0 (2,2) [*]
15,40	53,3 ± 13,8 (1,4)	24,3 ± 5,9 (1,6)	221,0 ± 15,9 (2,3) [*]	127,3 ± 11,5 (0,9)	Citotóxico	375,7 ± 15,3 (1,6) [*]	Citotóxico	515,0 ± 26,1 (1,9) [*]
MeOH								
DMSO	37,0 ± 3,6	15,3 ± 2,5	94,3 ± 3,5	133,3 ± 16,6	130,0 ± 12,3	233,0 ± 14,2	365,0 ± 12,7	272,7 ± 6,7
2,26	37,7 ± 3,51 (1,0)	19,7 ± 2,1 (1,3)	110,7 ± 7,6 (1,2)	156,0 ± 29,6 (1,2)	152,3 ± 12,0 (1,2)	257,3 ± 47,9 (1,1)	341,5 ± 7,8 (0,9)	325,3 ± 15,0 (1,2)
5,52	42,7 ± 5,1 (1,1)	19,0 ± 2,0 (1,2)	129,7 ± 2,5 (1,4)	152,3 ± 9,4 (1,1)	166,3 ± 4,7 (1,3)	276,3 ± 21,2 (1,2)	376,0 ± 9,9 (1,0)	301,7 ± 11,1 (1,1)
9,05	36,7 ± 6,7 (1,0)	16,3 ± 2,5 (1,1)	142,0 ± 3,6 (1,5) [*]	151,7 ± 5,0 (1,1)	148,7 ± 6,4 (1,1)	232,7 ± 7,2 (1,0)	340,0 ± 32,5 (0,9)	326,3 ± 8,7 (1,2)
13,57	32,3 ± 1,15 (0,9)	19,0 ± 2,0 (1,2)	176,3 ± 4,51 (1,9) [*]	165,3 ± 10,6 (1,2)	150,3 ± 8,0 (1,2)	194,0 ± 5,7 (0,8)	352,0 ± 15,6 (1,0)	316,3 ± 4,5 (1,2)
18,10	33,7 ± 3,5 (0,9)	17,3 ± 4,5 (1,1)	192,7 ± 7,6 (2,0) [*]	163,0 ± 9,0 (1,2)	144,3 ± 11,0 (1,1)	208,5 ± 19,1 (0,9)	336,5 ± 10,6 (0,9)	327,7 ± 8,5 (1,2)
Ctrl +	978,7 ± 54,1 ^a	1254,3 ± 124,3 ^b	1311,7 ± 157,6 ^c	1414,3 ± 125,1 ^b	1531,9 ± 122,5 ^a	1316,1 ± 133,1 ^b	1719,1 ± 218,1 ^d	2111,3 ± 231,1 ^b

DMSO: 100 µL/placa (controle negativo). Ctrl + (Controle Positivo): ^a NPD (4-nitro-*o*-phenilenediamina – 10,0 µg/placa); ^b 2-Antramina (1,25 µg/placa); ^c Azida Sódica (1,25 µg/placa); ^d Daunomicina (3,0 µg/placa). CHCl₃ – Extrato Clorofórmico; MeOH – Extrato Metanólico. ^{*} P < 0,01.

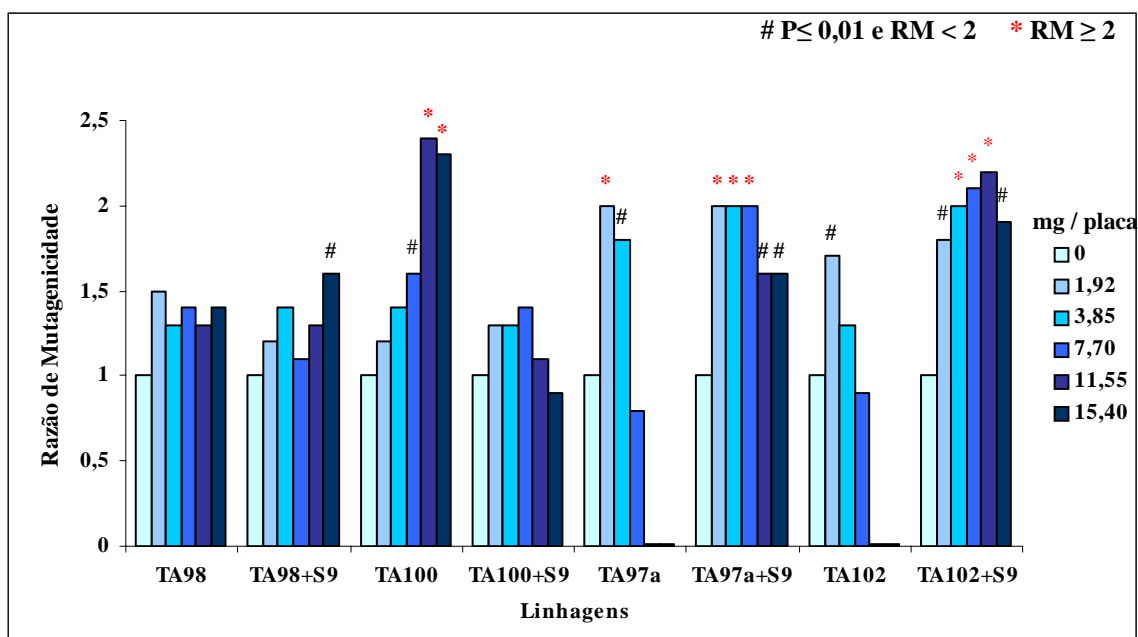


Figura 31. Valores de RM (razão de mutagenicidade) para as diferentes linhagens de *S. typhimurium*, após tratamento com extrato clorofórmico (CHCl_3) das folhas de *Q. grandiflora*, com e sem ativação metabólica (S9).

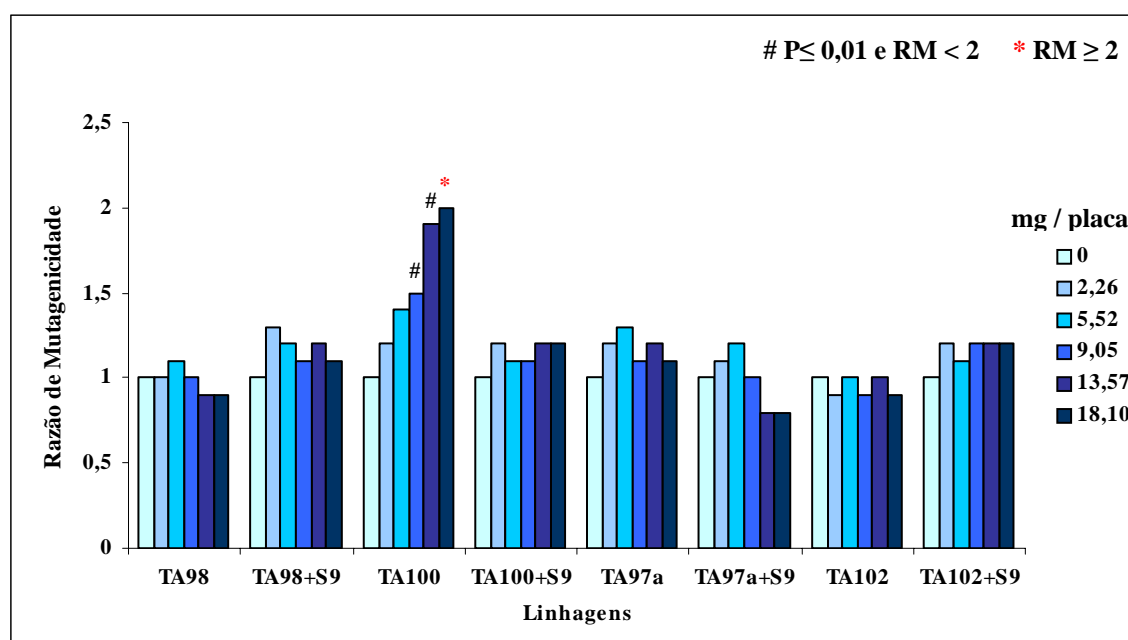


Figura 32. Valores de RM (razão de mutagenicidade) para as diferentes linhagens de *S. typhimurium*, após tratamento com extrato metanólico (MeOH) das folhas de *Q. grandiflora*, com e sem ativação metabólica (S9).

TABELA 9. Atividade mutagênica expressa pela média do número de revertentes, desvio padrão e razão de mutagenicidade (valor entre parênteses) nas linhagens TA98, TA100, TA97a e TA102 de *S. typhimurium* expostas à várias doses dos extratos clorofórmico e metanólico de *Q. multiflora*, com (+S9) ou sem (-S9) ativação metabólica.

Tratamento (mg/placa)	TA98		TA100		TA97a		TA102	
	- S9	+ S9	- S9	+ S9	- S9	+ S9	- S9	+ S9
CHCl₃								
DMSO	20,3 ± 4,0	31,3 ± 3,5	121,7 ± 14,5	104,3 ± 12,5	130,0 ± 12,3	155,0 ± 11,5	365,0 ± 12,7	323,7 ± 13,0
2,07	19,3 ± 1,3 (0,9)	33,3 ± 4,6 (1,1)	165,0 ± 7,0 (1,4)	136,3 ± 9,1 (1,3)	132,5 ± 14,8 (1,0)	185,3 ± 9,1 (1,2)	335,5 ± 13,4 (0,9)	363,7 ± 22,8 (1,1)
4,15	22,0 ± 5,2 (1,1)	36,3 ± 3,5 (1,2)	188,3 ± 3,1 (1,5)*	174,0 ± 9,8 (1,7)	163,5 ± 2,1 (1,3)	182,3 ± 6,7 (1,2)	356,0 ± 9,9 (1,0)	372,0 ± 13,9 (1,1)
8,30	17,3 ± 4,51 (0,8)	40,0 ± 5,57 (1,3)	226,3 ± 13,6(1,9)*	206,0 ± 9,2 (2,0)	157,0 ± 4,2 (1,2)	175,0 ± 13,1 (1,1)	393,0 ± 24,0 (1,1)	361,0 ± 14,4 (1,1)
12,45	16,3 ± 2,9 (0,8)	43,3 ± 3,1 (1,4)	262,0 ± 13,6 (2,1)	215,0 ± 12,8 (2,1)	227,5 ± 23,0(1,7)*	198,3 ± 15,9 (1,3)	393,0 ± 18,4 (1,1)	359,3 ± 15,4 (1,1)
16,60	22,3 ± 5,7 (1,1)	38,0 ± 4,36 (1,2)	321,0 ± 9,2 (2,7)	237,0 ± 6,6 (2,3)	212,5 ± 14,8(1,6)*	214,0 ± 13,2 (1,4)	396,5 ± 10,6 (1,1)	364,0 ± 6,0 (1,1)
MeOH								
DMSO	20,3 ± 4,0	31,3 ± 3,5	94,3 ± 3,5	118,0 ± 6,1	130,0 ± 12,3	155,0 ± 11,5	365,0 ± 12,7	323,7 ± 13,0
2,5	15,7 ± 4,0 (0,8)	35,7 ± 6,8 (1,1)	108,7 ± 8,3 (1,1)	95,0 ± 10,1 (0,9)	176,0 ± 5,0 (1,3)	173,7 ± 9,1 (1,1)	540,0 ± 5,7 (1,5)*	337,0 ± 3,5 (1,0)
5,0	21,0 ± 2,6 (1,0)	40,3 ± 4,0 (1,3)	130,0 ± 16,1 (1,4)	106,7 ± 7,0 (1,0)	172,0 ± 3,6 (1,3)	168,0 ± 12,5 (1,1)	538,0 ± 42,4(1,5)*	359,0 ± 8,9 (1,1)
10,0	39,7 ± 10,0 (1,9)*	36,7 ± 8,1 (1,2)	146,7 ± 14,0(1,5)*	105,7 ± 7,6 (1,0)	168,3 ± 4,2 (1,3)	173,3 ± 21,9 (1,1)	437,5 ± 20,5 (1,2)	379,3 ± 13,2 (1,2)
15,0	39,0 ± 3,6 (1,9)*	27,3 ± 4,7 (0,9)	183,7 ± 8,7 (1,9)*	105,7 ± 5,9 (1,0)	169,0 ± 5,6 (1,3)	196,7 ± 7,5 (1,3)	442,5 ± 9,9 (1,2)	362,0 ± 28,2 (1,1)
20,0	30,7 ± 4,6 (1,5)*	34,0 ± 3,0 (1,1)	213,7 ± 11,7 (2,3)	107,7 ± 8,3 (1,0)	223,0 ± 9,6 (1,7)*	178,3 ± 10,5 (1,1)	447,5 ± 19,1 (1,2)	366,3 ± 20,5 (1,1)
Ctrol +	1031,3 ± 116,3 ^a	1214,3 ± 171,3 ^b	1653,7 ± 137,1 ^c	1514,3 ± 115,1 ^b	1311,3 ± 141,9 ^a	1316,3 ± 119,3 ^b	1916,3 ± 218,2 ^d	2111,3 ± 231,1 ^b

DMSO: 100 µL/placa (controle negativo). Ctrol + (Controle Positivo): ^a NPD (4-nitro-*o*-phenilenediamina – 10,0 µg/placa); ^b 2-Antramina (1,25 µg/placa); ^c Azida Sódica (1,25 µg/placa); ^d Daunomicina (3,0 µg/placa). CHCl₃ – Extrato Clorofórmico; MeOH – Extrato Metanólico. * P < 0,01.

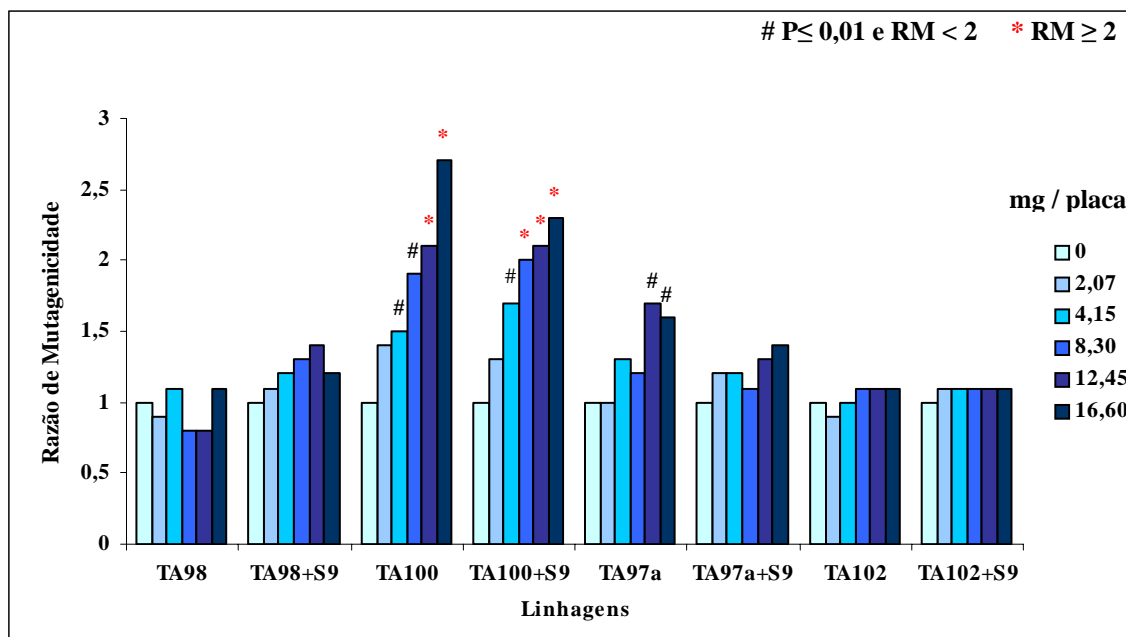


Figura 33. Valores de RM (razão de mutagenicidade) para as diferentes linhagens de *S. typhimurium*, após tratamento com extrato clorofórmico (CHCl_3) das folhas de *Q. multiflora*, com e sem ativação metabólica (S9).

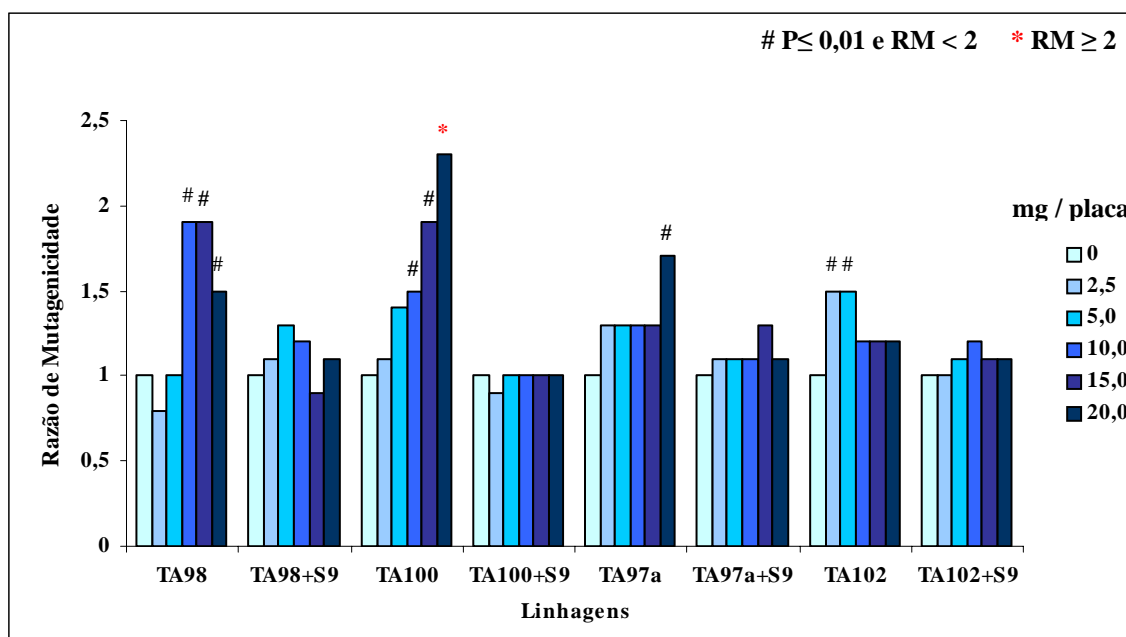


Figura 34. Valores de RM (razão de mutagenicidade) para as diferentes linhagens de *S. typhimurium*, após tratamento com extrato metanólico (MeOH) das folhas de *Q. multiflora*, com e sem ativação metabólica (S9).

TABELA 10. Atividade mutagênica expressa pela média do número de revertentes, desvio padrão e razão de mutagenicidade (valor entre parênteses) nas linhagens TA98, TA100, TA97a e TA102 de *S. typhimurium* expostas à várias doses dos extratos clorofórmico e metanólico de *Q. parviflora*, com (+S9) ou sem (-S9) ativação metabólica.

Tratamento (mg/placa)	TA98		TA100		TA97a		TA102	
	- S9	+ S9	- S9	+ S9	- S9	+ S9	- S9	+ S9
CHCl₃								
DMSO	34,3 ± 2,5	31,3 ± 3,5	151,0 ± 6,1	97,7 ± 4,7	112,5 ± 7,8	155,0 ± 11,5	365,0 ± 12,7	323,7 ± 13,0
0,94	37,7 ± 7,1 (1,1)	32,3 ± 4,0 (1,0)	158,0 ± 10,6 (1,0)	117,3 ± 8,1 (1,2)	164,0 ± 8,5 (1,5)	183,0 ± 10,4 (1,2)	368,0 ± 7,1 (1,0)	326,7 ± 9,7 (1,0)
1,87	44,3 ± 6,4 (1,3)	32,7 ± 4,7 (1,0)	177,0 ± 18,1 (1,2)	133,7 ± 4,2 (1,4)	157,0 ± 5,7 (1,4)	215,7 ± 9,1 (1,4)	361,5 ± 17,7 (1,0)	322,7 ± 20,2 (1,0)
3,75	40,0 ± 5,3 (1,2)	38,3 ± 2,5 (1,2)	167,3 ± 1,5 (1,1)	110,3 ± 5,1 (1,1)	175,0 ± 7,1 (1,6)*	209,3 ± 11,5 (1,3)	390,0 ± 9,9 (1,1)	300,0 ± 15,5 (0,9)
5,62	40,7 ± 6,4 (1,2)	35,3 ± 3,8 (1,1)	168,7 ± 16,2 (1,1)	111,0 ± 5,6 (1,1)	166,0 ± 8,5 (1,5)*	196,3 ± 8,7 (1,3)	326,5 ± 29,0 (0,9)	272,3 ± 9,1 (0,8)
7,50	38,3 ± 3,5 (1,1)	32,0 ± 6,0 (1,0)	175,7 ± 14,6 (1,2)	106,3 ± 13,6 (1,1)	167,5 ± 6,4 (1,5)*	226,3 ± 11,1 (1,5)*	Citotóxico	261,3 ± 11,5 (0,8)
MeOH								
DMSO	34,3 ± 2,5	31,3 ± 3,5	151,0 ± 6,1	97,7 ± 4,7	112,5 ± 7,8	155,0 ± 11,5	365,0 ± 12,7	323,7 ± 13,0
2,84	41,0 ± 2,0 (1,2)	36,7 ± 10,2 (1,2)	161,3 ± 15,6 (1,1)	126,0 ± 3,6 (1,3)	160,5 ± 21,9 (1,4)	164,3 ± 20,4 (1,1)	386,0 ± 15,6 (1,1)	318,3 ± 11,7 (1,0)
5,67	40,7 ± 2,1 (1,2)	40,3 ± 5,5 (1,3)	167,3 ± 11,7 (1,1)	99,3 ± 2,5 (1,0)	150,0 ± 8,5 (1,3)	207,3 ± 10,3 (1,3)	471,5 ± 12,0 (1,3)	344,0 ± 6,2 (1,1)
11,35	44,0 ± 6,2 (1,3)	30,0 ± 8,5 (1,0)	163,0 ± 4,6 (1,1)	103,7 ± 3,1 (1,1)	121,5 ± 7,8 (1,1)	165,3 ± 12,3 (1,1)	336,0 ± 11,3 (0,9)	326,3 ± 19,1 (1,0)
17,02	46,3 ± 6,7 (1,3)	34,0 ± 1,73 (1,1)	103,7 ± 3,5 (0,7)	104,7 ± 6,0 (1,1)	137,0 ± 8,5 (1,2)	169,7 ± 17,9 (1,1)	320,5 ± 33,2 (0,9)	303,7 ± 7,4 (0,9)
22,70	37,3 ± 5,13 (1,1)	33,0 ± 7,9 (1,0)	Citotóxico	98,0 ± 4,6 (1,0)	130,5 ± 7,9 (1,2)	196,7 ± 8,7 (1,3)	Citotóxico	280,0 ± 17,1 (0,9)
Ctrol +	913,3 ± 110,1 ^a	1114,3 ± 113,3 ^b	1212,6 ± 87,1 ^c	1412,6 ± 123,3 ^b	1319,3 ± 121,1 ^a	1299,3 ± 116,4 ^b	1765,1 ± 211,9 ^d	1991,3 ± 211,3 ^b

DMSO: 100 µL/placa (controle negativo). Ctrol + (Controle Positivo): ^a NPD (4-nitro-*o*-phenilenediamina – 10,0 µg/placa); ^b 2-Antramina (1,25 µg/placa); ^c Azida Sódica (1,25 µg/placa); ^d Daunomicina (3,0 µg/placa). CHCl₃ – Extrato Clorofórmico; MeOH – Extrato Metanólico. * P < 0,01.

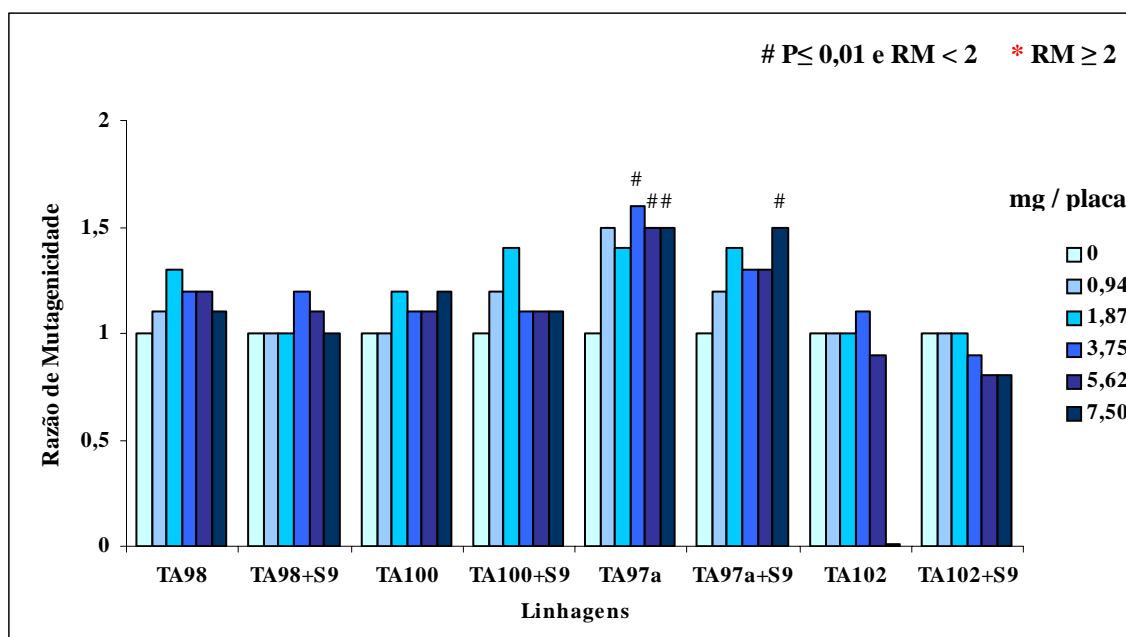


Figura 35. Valores de RM (razão de mutagenicidade) para as diferentes linhagens de *S. typhimurium*, após tratamento com extrato clorofórmico (CHCl_3) das folhas de *Q. parviflora*, com e sem ativação metabólica (S9).

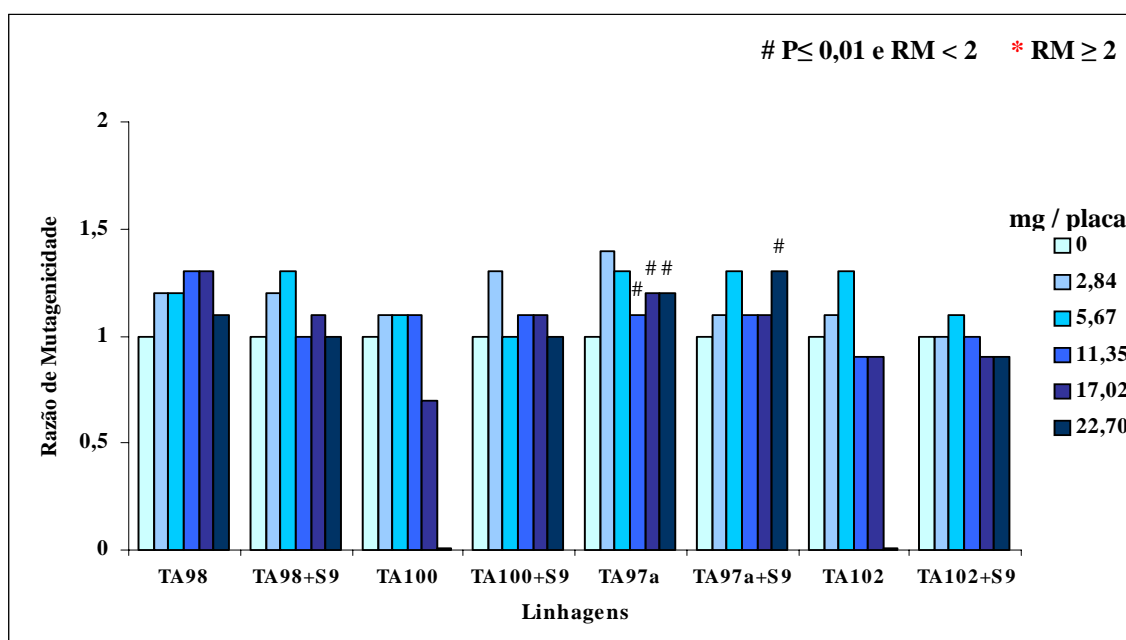


Figura 36. Valores de RM (razão de mutagenicidade) para as diferentes linhagens de *S. typhimurium*, após tratamento com extrato metanólico (MeOH) das folhas de *Q. parviflora*, com e sem ativação metabólica (S9).

4.1.6 *Strychnos pseudoquina*

Os resultados obtidos com os compostos obtidos de *S. pseudoquina* podem ser observados no artigo, já publicado e em anexo, no capítulo 2 do presente trabalho.

4.1.7 Substâncias Isoladas

Além dos extratos brutos e das frações enriquecidas, foram avaliadas quanto à mutagenicidade *in vitro* alguns compostos isolados, obtidos de diferentes plantas. Na Tabela 11 podem ser verificadas as plantas onde cada uma dessas substâncias testadas ocorre.

Os resultados obtidos estão reunidos na Tabela 12. Podemos verificar que a amentoflavona e a quercetina aglicona foram mutagênicas para a linhagem TA98 (-S9/+S9). Os demais compostos não alteraram significativamente a frequência de revertentes para essa linhagem.

TABELA 11. Relação das substâncias puras avaliadas quanto à mutagenicidade e sua ocorrência nas diferentes espécies vegetais estudadas

Substância	Espécie Vegetal onde é encontrada
α-Amirina	<i>B. basiloba</i>
Friedelina	<i>B. basiloba</i>
Catequina	<i>B. basiloba</i>
Galato de Metila	<i>A. castaneifolia</i> <i>A. glandulosa</i> <i>A. triplinervia</i> <i>B. basiloba</i>
Amentoflavona	<i>A. castaneifolia</i> <i>A. glandulosa</i> <i>A. triplinervia</i>
Quercetina	<i>A. castaneifolia</i> <i>A. glandulosa</i> <i>A. triplinervia</i> <i>M. pusa</i>
Quercetina-3-O-α-L-arabinopiranosídeo	<i>B. basiloba</i> <i>M. pusa</i>
Quercetina-3-O-β-D-galactopiranosídeo	<i>A. castaneifolia</i> <i>A. glandulosa</i> <i>A. triplinervia</i> <i>M. pusa</i>

TABELA 12. Atividade mutagênica expressa pela média do número de revertentes, desvio padrão e razão de mutagenicidade (valor entre parênteses) na linhagem TA98 de *S. typhimurium* exposta à várias doses de compostos isolados das diferentes espécies vegetais estudadas, com (+S9) ou sem (-S9) ativação metabólica.

Tratamento (mg/placa)	TA98	
	- S9	+ S9
DMSO	37,0 ± 5,6	27,5 ± 0,71
<i>α</i>-Amirina		
0,78	39,0 ± 2,5 (1,0)	27,0 ± 4,2 (1,0)
1,05	41,0 ± 1,3 (1,1)	28,5 ± 3,5 (1,0)
1,31	36,0 ± 2,1 (1,0)	25,0 ± 4,2 (0,9)
Friedelina		
0,38	33,0 ± 2,5 (0,9)	27,0 ± 7,1 (1,0)
0,57	36,5 ± 1,1 (1,0)	34,0 ± 7,1 (1,2)
0,76	35,0 ± 1,3 (0,9)	31,0 ± 1,4 (1,1)
0,95	41,0 ± 1,1 (1,1)	26,0 ± 4,2 (0,9)
Catequina		
0,15	35,0 ± 2,5 (0,9)	26,0 ± 4,2 (0,9)
0,48	49,0 ± 1,3 (1,3)	25,0 ± 1,4 (0,9)
0,80	41,0 ± 1,1 (1,1)	26,5 ± 3,5 (1,0)
Galato de Metila		
0,08	49,0 ± 8,5 (1,3)	25,0 ± 1,4 (0,9)
0,24	46,5 ± 8,9 (1,2)	30,5 ± 0,7 (1,1)
0,40	54,0 ± 4,0 (1,4)	34,0 ± 1,4 (1,2)
Amentoflavona		
0,28	62,0 ± 3,4 (1,7)*	49,0 ± 2,8 (1,8)*
0,56	98,5 ± 12,5 (2,7)*	60,5 ± 0,7 (2,2)*
0,84	133,0 ± 10,4 (3,6)*	62,0 ± 1,4 (2,2)*
1,12	70,0 ± 1,7 (1,9)*	77,0 ± 12,7 (2,8)*
Quercetina		
0,02	1316 ± 121,3 (35,6)*	1173 ± 60,8 (42,6)*
0,15	1292 ± 49,7 (34,9)*	1215,5 ± 178,9 (44,2)*
0,30	1592 ± 42,7 (43,0)*	1367 ± 72,1 (49,7)*
0,50	1958 ± 52,9 (52,9)*	1242 ± 76,4 (45,2)*
Quercetina-3-O-<i>α</i>-L-arabinopiranosídeo		
0,05	42,0 ± 3,5 (1,1)	29,5 ± 2,1 (1,1)
0,11	43,0 ± 3,1 (1,2)	30,5 ± 2,1 (1,2)
0,22	53,5 ± 4,0 (1,4)	29,5 ± 6,4 (1,1)
0,44	56,0 ± 3,5 (1,5)	26,5 ± 3,5 (1,0)
Quercetina-3-O-<i>β</i>-D-galactopiranosídeo		
0,06	44,0 ± 4,0 (1,2)	30,0 ± 5,7 (1,1)
0,07	48,0 ± 3,5 (1,3)	29,0 ± 2,8 (1,0)
0,10	46,0 ± 6,4 (1,2)	30,0 ± 2,8 (1,1)
Ctrol+	1023 ± 10	1552 ± 70

DMSO: 100 µL/placa (controle negativo). Ctrol + (Controle Positivo): ^a NPD (4-nitro-*o*-phenilenediamina – 10,0 µg/placa). * P≤0,01.

4.2 Resultados *in vivo* – Extratos polares

Para avaliação da mutagenicidade dos extratos vegetais foi empregado o teste do micronúcleo em células do sangue periférico de camundongos submetidos a tratamento agudo. Foram avaliados apenas os extratos polares (metanólicos) das seguintes espécies: *A. glandulosa*, *A. triplinervia*, *M. pusa*, *Q. grandiflora*, *Q. multiflora* e *S. pseudoquina*. Os resultados podem ser visualizados na Tabela 13 e nas Figuras de 37 a 42. Podemos verificar que os extratos metanólicos obtidos das espécies *A. castaneifolia*, *A. glandulosa*, *A. triplinervia* e *Q. parviflora* foram mutagênicos nas maiores doses avaliadas, uma vez que houve uma diferença estatística significativa ao nível de 1% em relação ao grupo controle negativo. Já o extrato da espécie *Q. multiflora* aumentou a frequência de células micronucleadas ao nível de 5% de significância em relação ao controle negativo, demonstrando uma mutagenicidade mais baixa.

TABELA 13. Número de células micronucleadas por animal, média e desvio padrão (SD) para camundongos tratados com os extratos polares de diferentes espécies vegetais, diluídos em água destilada, via gavagem.

Tratamentos (mg/kg p.c.)	Animais										Média	SD
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
Ctrl +	22	ND	17	18	20	18	18	22	20	19	19,33**	1,80
Ctrl -	2	1	1	3	1	2	1	2	1	0	1,40	0,84
<i>Alchornea castaneifolia</i>												
1290	4	6	3	4	5	5	5	4	4	4	4,4**	0,84
967,5	2	3	2	4	1	2	3	2	3	1	2,3	0,95
645,0	3	2	2	3	1	2	3	3	2	2	2,3	0,67
<i>Alchornea glandulosa</i>												
1250	4	3	5	4	5	6	4	4	3	4	4,20**	0,92
937,5	2	2	1	1	2	3	2	4	2	1	2,00	0,94
625	1	0	2	1	3	1	2	2	1	1	1,40	0,84
<i>Alchornea triplinervia</i>												
1333	5	4	4	5	6	4	3	5	4	5	4,50**	0,85
999,75	3	2	3	1	3	2	4	2	3	2	2,5	0,85
666,5	2	3	2	2	3	1	3	2	2	3	2,3	0,67
<i>Mouriri Pusa</i>												
1330	0	2	3	2	1	ND	3	1	0	1	1,44	1,13
997,5	2	1	1	2	1	1	0	ND	1	3	1,33	0,87
665	1	2	3	1	2	1	2	1	ND	2	1,67	0,71
<i>Qualea grandiflora</i>												
1818	1	0	2	1	2	1	2	2	1	2	1,38	0,74
1363	1	3	1	2	2	1	3	1	2	1	1,75	0,89
909	1	2	2	2	1	1	3	ND	1	2	1,67	0,71
<i>Qualea multiflora</i>												
1711,6	0	4	1	3	2	2	0	3	3	3	2,10	1,37
1283,7	2	4	4	2	3	2	3	2	2	4	2,80*	0,92
855,8	1	2	2	1	3	2	1	2	1	2	1,70	0,67

Ctrl + (Controle Positivo): Ciclofosfamida 50 mg/kg p.c.; Ctrl - (Controle Negativo): Água Destilada; ND - Não determinado; * P≤0,05; **P≤0,01.

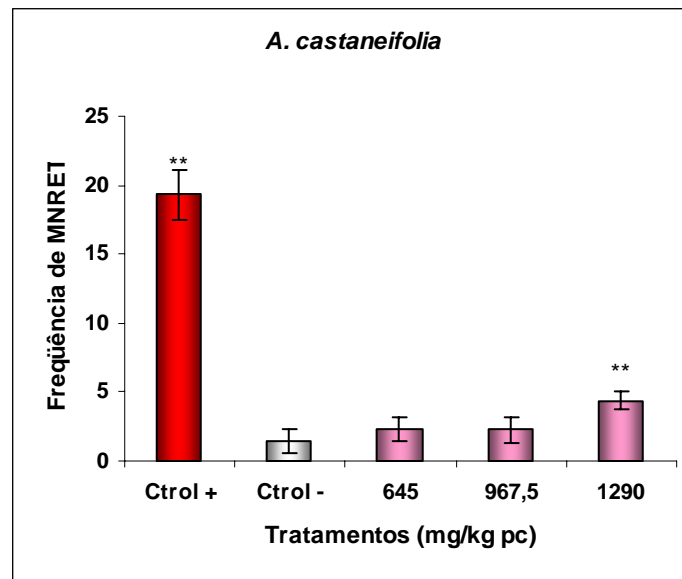


Figura 37. Frequência média de reticulócitos micronucleados (MNRET) e desvio padrão para 1000 células obtidas de camundongos tratados com diferentes doses do extrato metanólico de *A. castaneifolia*, ciclofosfamida (CPA) ou água destilada.

** $P \leq 0,01$

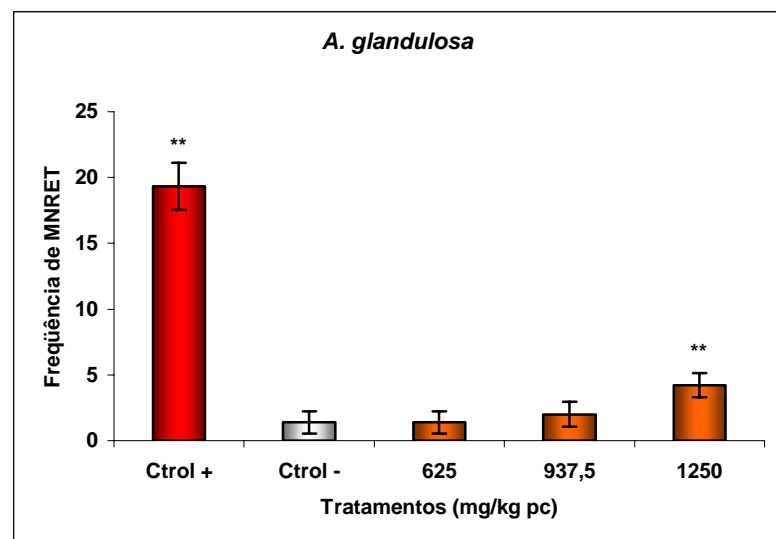


Figura 38. Frequência média de reticulócitos micronucleados (MNRET) e desvio padrão para 1000 células obtidas de camundongos tratados com diferentes doses do extrato metanólico de *A. glandulosa*, ciclofosfamida (CPA) ou água destilada.

** $P \leq 0,01$.

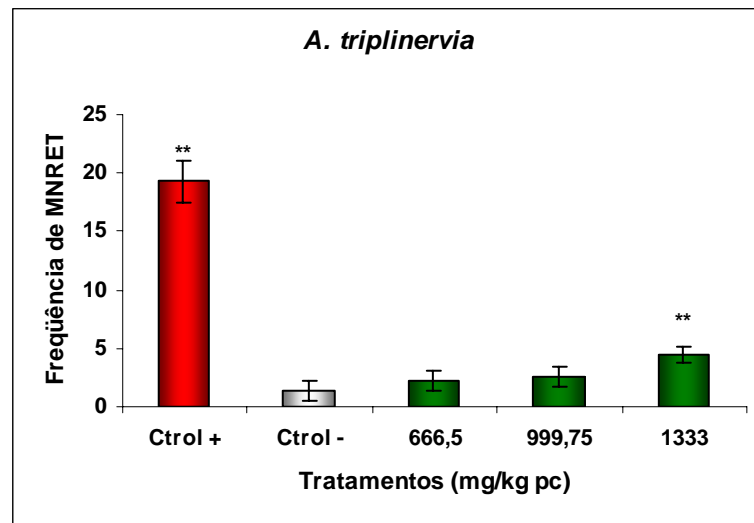


Figura 39. Frequência média de reticulócitos micronucleados (MNRET) e desvio padrão para 1000 células obtidas de camundongos tratados com diferentes doses do extrato metanólico de *A. triplinervia*, ciclofosfamida (CPA) ou água destilada.

** $P \leq 0,01$

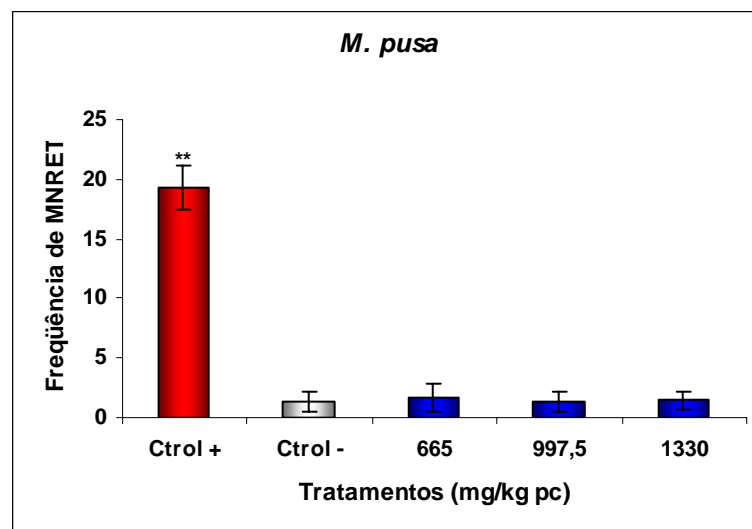


Figura 40. Frequência média de reticulócitos micronucleados (MNRET) e desvio padrão para 1000 células obtidas de camundongos tratados com diferentes doses do extrato metanólico de *M. pusa*, ciclofosfamida (CPA) ou água destilada. ** $P \leq 0,01$.

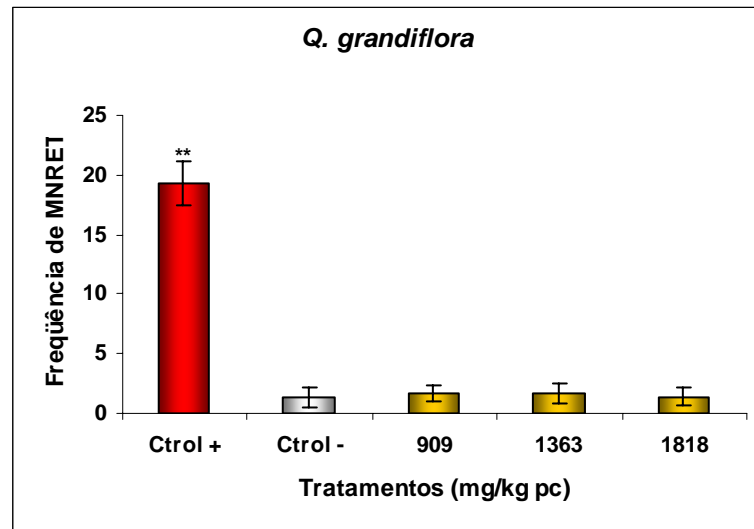


Figura 41. Frequência média de reticulócitos micronucleados (MNRET) e desvio padrão para 1000 células obtidas de camundongos tratados com diferentes doses do extrato metanólico de *Q. grandiflora*, ciclofosfamida (CPA) ou água destilada.

** $P \leq 0,01$

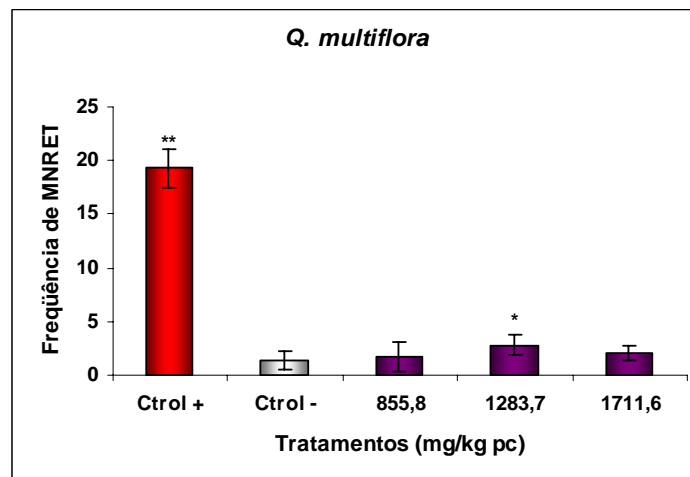


Figura 42. Frequência média de reticulócitos micronucleados (MNRET) e desvio padrão para 1000 células obtidas de camundongos tratados com diferentes doses do extrato metanólico de *Q. multiflora*, ciclofosfamida (CPA) ou água destilada.

** $P \leq 0,01$; * $P \leq 0,05$.

5. DISCUSSÃO

Os estudos científicos envolvendo espécies vegetais têm se revelado, a cada dia, de suma importância, não apenas em níveis acadêmicos, mas principalmente em termos econômicos e sociais. Cada vez mais as pessoas vêm fazendo uso de tratamentos medicinais alternativos e de plantas medicinais e as indústrias farmacêuticas e de cosméticos têm buscado em fontes naturais as matérias primas e princípios ativos para seus produtos.

Esse crescimento no interesse por tratamentos alternativos pela população pode ser derivado de um desapontamento em relação aos tratamentos alopáticos convencionais, em função dos efeitos colaterais promovidos. Porém, em muitos casos, as pessoas parecem desconhecer que os tratamentos baseados em plantas medicinais também podem trazer sérios riscos. Os diagnósticos geralmente são imprecisos e várias doenças graves podem ter seus sintomas ocultados por essa prática (ELVIN-LEWIS, 2001).

Outro fator que pode estar chamando a atenção para o uso de produtos naturais é o fato de que grande parte dos medicamentos utilizados nos dias de hoje têm em sua constituição moléculas descobertas na natureza. Cerca de 30% do mercado farmacêutico mundial é representado por drogas derivadas de produtos naturais (BASSO et al., 2005).

Entretanto, o crescimento desordenado das áreas urbanas e as alterações climáticas ocasionadas pela poluição estão pondo em risco essa fonte

riquíssima de moléculas biologicamente ativas. De acordo com a International Union for Conservation of Nature and Natural Resources (IUCN) e com o World Wide Fund for Nature (WWF) cerca de sessenta mil espécies de plantas superiores estarão extintas, ou perto disso, até a metade desse século (ETKIN, 1998). E o que agrava ainda mais a situação é que muitas dessas espécies vegetais poderão ser perdidas antes mesmo de terem suas propriedades químicas e biológicas estudadas.

No Brasil essa situação de devastação da natureza é especialmente concreta. A maioria dos biomas presentes em nosso território se encontra em estágios avançados de destruição e muito pouco se tem feito no sentido de se reverter essa condição.

O exemplo do Cerrado brasileiro deixa claro quão elevado são os níveis dessa degradação. Estudos demonstram que até 1995 cerca de 50% do Cerrado já haviam sido destruídos e substituídos por áreas agrícolas, especialmente para a produção de grãos (ALHO e SOUZA MARTINS, 1995 apud JEPSON, 2005). E a destruição pode ser completa até 2030, caso os níveis de desmatamento continuem como nos dias atuais. Essa informação faz parte de um relatório técnico do grupo Conservação Internacional - Brasil (MACHADO et al., 2004) que afirma que cerca de 2,2 milhões de hectares de áreas de cerrado vêm sendo destruídos todos os anos.

A situação de destruição descontrolada desse bioma só poderá ser controlada a partir do momento em que os órgãos ambientais responsáveis se posicionarem de forma concreta criando novas unidades de conservação e melhorando as condições de proteção das já existentes. Isso poderá garantir não apenas um relativo

equilíbrio ambiental, mas também pode permitir a manutenção da possibilidade de pesquisas de bioprospecção, na busca por moléculas novas de interesse para a sociedade.

Mas, além da conservação das espécies vegetais que apresentam potencial farmacológico para estudos de bioprospecção, também se faz necessária a valorização dos conhecimentos populares acerca dos usos medicinais das plantas. Os seres humanos fazem uso de produtos naturais desde os tempos mais remotos e todo o conhecimento acumulado nesse período sobre as propriedades benéficas e nocivas das plantas pode ser muito relevante.

Segundo Basso et al. (2005) os estudos de bioprospecção podem seguir três linhas principais: a abordagem randômica, a abordagem ecológica ou a abordagem etnobotânica. A abordagem randômica é muito dispendiosa e bastante desestimulante, uma vez que a busca por novas moléculas com atividades biológicas se dá de forma aleatória e a taxa de sucessos é muito baixa. A abordagem ecológica se baseia na observação do comportamento dos animais selvagens em relação às espécies vegetais de uma área. Por exemplo, se em uma área infestada por herbívoros não houver a predação de uma determinada espécie vegetal, pode-se inferir que essa planta apresenta compostos tóxicos em sua constituição química. A terceira abordagem para a bioprospecção, a etnobotânica, se baseia na utilização de espécies vegetais no tratamento de doenças pelas populações cujas tradições ainda se mantenham. Essa última abordagem com certeza tem se mostrado a mais promissora.

E várias podem ser as fontes de informações para que essa abordagem seja posta em prática pelos estudiosos. As medicinas tradicionais chinesa e indiana, bem como os conhecimentos das populações indígenas remanescentes das Américas, dentre outras, podem servir como base para a seleção de espécies à serem estudadas, na busca por novas moléculas. Vários têm sido os estudos que estão encontrando, nessas fontes populares, indicações de plantas realmente com potencial farmacológico, geralmente com atividades relacionadas àquelas às quais são indicadas nos tratamentos tradicionais.

Estudos com a espécie *Artemisia annua*, que faz parte da farmacopéia chinesa e tem indicação para o tratamento da malária, demonstraram que seu princípio ativo, a artemisina, atua efetivamente controlando os sintomas dessa doença (Mueller et al., 2004). Uma revisão realizada por Li et al. (2004) fez um levantamento de uma série de espécies vegetais dessa mesma farmacopéia que apresentaram um efetivo efeito contra a *diabete mellitus* e suas complicações. Outros estudos demonstraram também atividades anti-HIV (WANG et al., 2006) e antioxidante (WONG et al., 2006; CAI et al., 2004), bem como uma efetiva colaboração no tratamento de pacientes com câncer (WONG et al., 2001)

As plantas da farmacopéia indiana também vêm sendo estudadas, e muitos destes estudos têm demonstrado efeitos biológicos bastante positivos. Jainu e Devi (2006) verificaram que um extrato obtido da espécie *Solanun nigrum* foi efetivo contra úlceras gástricas; a Ayurveda indica uma preparação que emprega essa espécie vegetal para o tratamento dessa doença. A eficiência no controle da *diabete mellitus* através de tratamentos medicinais com plantas da Ayurveda também foi comprovada

para várias espécies (MUKHERJEE et al., 2006). Também foi verificada a presença de compostos com atividade anti-inflamatória (SINGH et al., 2006) e antioxidante (SCARTEZZINI et al., 2006) em plantas utilizadas na medicina tradicional indiana.

Mas não são apenas as medicinas tradicionais chinesa e indiana que vêm sendo avaliadas em estudos científicos. Um estudo com espécies vegetais empregada pelos índios Chacobo, nativos da região amazônica da Bolívia, demonstraram a presença de compostos químicos efetivos no tratamento da malária (Muños et al., 2000).

Todas essas informações demonstram que as espécies vegetais são realmente uma fonte riquíssima de compostos químicos com potencial farmacológico, e que os conhecimentos populares acerca de sua utilização podem ser importantes no momento da escolha de plantas a serem objeto de estudos. Entretanto, as plantas medicinais podem representar sérios riscos em sua utilização. Os efeitos adversos decorrentes da utilização de plantas medicinais não estão bem documentados (TAYLOR et al., 2003).

Segundo uma revisão realizada por Elvin-Lewis (2001), vários problemas podem estar associados ao consumo por longos períodos de remédios baseados em plantas medicinais. Como exemplo, dentre várias espécies e problemas de saúde, pode-se citar plantas utilizadas como laxativos (*Senna alexandrina*, *Aloe vera* e *Rhamnus frangula*), que estão relacionadas a dores abdominais e problemas cardíacos, bem como plantas utilizadas como estimulantes (*Areca catechu*, *Ephedra sinica* e *Paullinia cupana*), que estão sendo relacionadas com disfunções hepáticas,

agitação, palpitações e insônia. Vários casos de hepatotoxicidade também são relatados.

Além dos problemas supracitados, os riscos do consumo de medicamentos tradicionais também estão associados ao fato de que a regulamentação da prescrição e produção desses compostos varia muito de acordo com a região do planeta, mas em grande parte dos países, ainda é ineficaz. No caso da medicina tradicional chinesa, como as formulações são preparadas individualmente e raramente são rotuladas, se torna praticamente impossível, no caso de efeitos adversos, a identificação dos problemas. Na Europa os padrões regulatórios variam de país para país e assim não se pode assegurar a composição exata, a eficiência ou a segurança de praticamente nenhum medicamento derivado de plantas (ELVIN-LEWIS, 2001).

Muitas plantas apresentam em sua constituição compostos químicos que podem ser citotóxicos ou genotóxicos, podendo até mesmo estar relacionados ao desenvolvimento de tumores (AMES, 1983). Várias espécies utilizadas tradicionalmente pela população sul-africana tiveram sua genotoxicidade avaliada, sendo que várias delas ocasionaram quebras cromossômicas (TAYLOR et al., 2003).

Assim, verifica-se que é imperativa a realização de ensaios para a avaliação da mutagenicidade (MARQUES et al., 2003), bem como de outros riscos decorrentes do consumo de produtos naturais pela população. No Brasil, a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) determina, através da Resolução nº 90, de 2004, que todo medicamento fitoterápico deve ser avaliado quanto à sua toxicidade aguda ou por doses repetidas, bem como quanto à genotoxicidade. Para a avaliação da

genotoxicidade, caso os fitoterápicos sejam utilizados em tratamentos de longa duração, a ANVISA determina que sejam empregados os testes de Ames e do Micronúcleo. Várias outras agências internacionais citam o teste do micronúcleo sendo um dos primeiros de uma série de ensaios a serem realizados para a análise do potencial genotóxico de substâncias (KRISHNA e HAYASHI, 2000). Da mesma forma, o teste Ames é mundialmente reconhecido quanto à sua eficiência na detecção de mutações pontuais por diferentes agentes.

Sendo assim, no presente estudo foi avaliada, quanto à mutagenicidade, uma série de compostos derivados de espécies vegetais utilizadas pela medicina tradicional brasileira. Foram escolhidas dez plantas nativas do cerrado, com base em estudos etnofarmacológicos, que as relacionaram com efeitos anti-úlceras.

Esse trabalho faz parte de um projeto temático realizado dentro do Programa Biota-Fapesp, que recebe o nome: “Uso sustentável da biodiversidade brasileira: prospecção químico-farmacológica em plantas superiores” e está sob a coordenação do Prof. Dr. Wagner Vilegas, do Departamento de Química Orgânica do Instituto de Química da UNESP de Araraquara. Esse projeto temático reúne laboratórios de várias áreas do conhecimento que estão realizando ensaios para avaliação de diferentes atividades biológicas para compostos vegetais, dentre elas, atividade anti-úlceras, anti-inflamatória, atividade anti-micobactéria, dentre outras.

Para facilitar a discussão dos resultados obtidos nos diferentes ensaios de mutagenicidade, vamos fazer uma subdivisão, de acordo com as espécies estudadas.

5.1 Gênero *Alchornea*

Foram avaliados quanto à mutagenicidade os extratos metanólicos e clorofórmicos de três diferentes espécies do gênero *Alchornea*: *A. castaneifolia*, *A. glandulosa* e *A. triplinervia*. As espécies vegetais desse gênero apresentam um uso popular bastante pronunciado, especialmente na África e na América do Sul (SCHWONTKOWSKI, 1993). Estudos fitoquímicos prévios em espécies do gênero *Alchornea* demonstraram a presença de flavonóides, ácidos fenólicos, alcalóides e terpenos (CONEGERO et al., 2003).

Na análise fitoquímica dos extratos apolares, realizada, dentro do projeto temático, pelo laboratório do Prof. Dr. Wagner Vilegas, verificou-se uma composição química muito semelhante entre as três espécies. Foram identificados nesses extratos os esteróides estigmasterol, campesterol e β -sitosterol. De acordo com Kritchevsky e Chen (2005) esses são os fitoesteróides mais comuns na natureza. Em *A. triplinervia* foi verificada também a presença de um isoprenóide.

Essa composição química pode explicar a ausência de mutagenicidade observada após o tratamento com esse composto no Teste de Ames (Tabelas 1, 2 e 3). Em nenhum dos casos houve alterações na frequência de revertentes em relação ao controle negativo. Um estudo realizado por Wolfreys e Hepburn (2002), empregando diferentes testes de mutagenicidade para avaliar a atividade de fitoesteróides esterificados, demonstrou que esses compostos não ocasionaram danos genéticos *in vitro* ou *in vivo*. A análise química desses fitoesteróides revelou a presença de estigmasterol, campesterol e β -sitosterol.

Além de não apresentarem atividade mutagênica, os fitoesteróides são considerados seguros para o consumo em vários outros aspectos (KRITCHEVSKY e CHEN, 2005), apresentando também uma série de atividades biológicas importantes. Eles têm sido relacionados, por exemplo, à prevenção de diferentes tipos de câncer (AWAD e FINK, 2000) e à redução dos níveis de colesterol no sangue (KRITCHEVSKY e CHEN, 2005).

Conforme explicitado anteriormente, os extratos apolares de nenhuma das espécies estudadas, incluindo os extratos clorofórmicos de *Alchornea*, não foram avaliados quanto à mutagenicidade através do Teste do Micronúcleo *in vivo*. Não foi possível obter uma diluição homogênea desses extratos em nenhum dos solventes compatíveis com ensaios em animais.

Ao contrário dos resultados negativos observados para o extrato clorofórmico das três espécies de *Alchornea* avaliadas nesse estudo, seus extratos metanólicos apresentaram mutagenicidade *in vitro* (Tabelas 1, 2 e 3). Entretanto, apesar das semelhanças nos perfis químicos das três espécies, foram observadas algumas diferenças nas respostas coletadas. As três espécies foram mutagênicas para a linhagem TA98, especialmente após a ativação metabólica. Porém, o extrato metanólico de *A. glandulosa* demonstrou indícios de mutagenicidade em todas as linhagens, com e sem S9, enquanto *A. triplinervia* foi mutagênica para a linhagem TA97a (+S9) e não apresentou indícios de mutagenicidade nas demais linhagens. *A. castaneifolia* apresentou mutagenicidade apenas para a linhagem TA98 (-S9 / +S9).

Esses resultados, que mostram um efeito mutagênico mais evidente nas linhagens TA98 e TA97, nos permitem afirmar que existem nesses extratos substâncias capazes de causar mutações do tipo *frameshift*. A diferença nas respostas observadas, apesar da presença dos mesmos compostos químicos nos extratos, pode estar relacionada à variações nas concentrações desses compostos.

A análise fitoquímica desses extratos revelou a presença de ácido gálico, galato de metila, amentoflavona, quercetina, quercetina-3-O- α -L-arabinopiranosídeo, quercetina-3-O- β -D-galactopiranosídeo. Uma variação observada foi que em *A. glandulosa* foi identificada a miricetina-3-O- α -L-raminopiranosídeo, além dos compostos supracitados, e em *A. triplinervia* verificou-se a quercetina-7-O- β -D-glucopiranosídeo. Também foi constatada a presença de alcalóides nos extratos, mas estes não puderam ser identificados, uma vez que sua decomposição se deu de forma muito acelerada. Essa composição química demonstra a presença de vários compostos fenólicos, que podem estar diretamente relacionados com a atividade mutagênica observada. Muitos trabalhos demonstram que esses compostos são capazes de ocasionar danos ao DNA (JURADO et al., 1991; GASPAR et al., 1993; LABIENIEC et al., 2003)

Os ensaios de mutagenicidade realizados com algumas substâncias isoladas (Tabela 12) demonstraram que, dos compostos encontrados nas plantas desse gênero, apenas a quercetina aglicona e a amentoflavona foram mutagênicas. Os derivados glicosilados da quercetina não demonstraram atividade mutagênica, bem como o galato de metila.

Todos esses dados estão de acordo com a literatura. A quercetina é reconhecida como uma substância capaz de ocasionar mutações *frameshift* e por substituição de bases (MACGRAGOR, 1983). Segundo Gaspar et al. (1993) a quercetina é o agente responsável pela mutagenicidade do vinho tinto e essa mutagenicidade é causada provavelmente pela formação de espécies reativas de oxigênio num processo de auto-oxidação. Ainda com relação à mutagenicidade da quercetina aglicona, Silva et al. (2002) afirmam que doses relativamente altas desse composto causaram baixa mutagenicidade *in vivo*, o que foi detectado através do teste do micronúcleo e do cometa em células de camundongos.

Porém, os derivados glicosilados da quercetina não apresentaram a mesma mutagenicidade. De acordo com uma revisão realizada por Heim et al (2002) a estrutura molecular do flavonóide (Figura 43) está diretamente relacionada à sua atividade biológica, seja ela uma atividade antioxidante ou uma atividade pró-oxidante. Esses autores citam alguns fatores que afetam a reatividade de um flavonóide:

- o número de hidroxilas na molécula;
- a presença de uma dupla ligação entre os carbonos 2 e 3 do anel C da estrutura nuclear do flavonóide, associada à uma função éster no carbono 4;
- ser aglicona;
- polimerização.

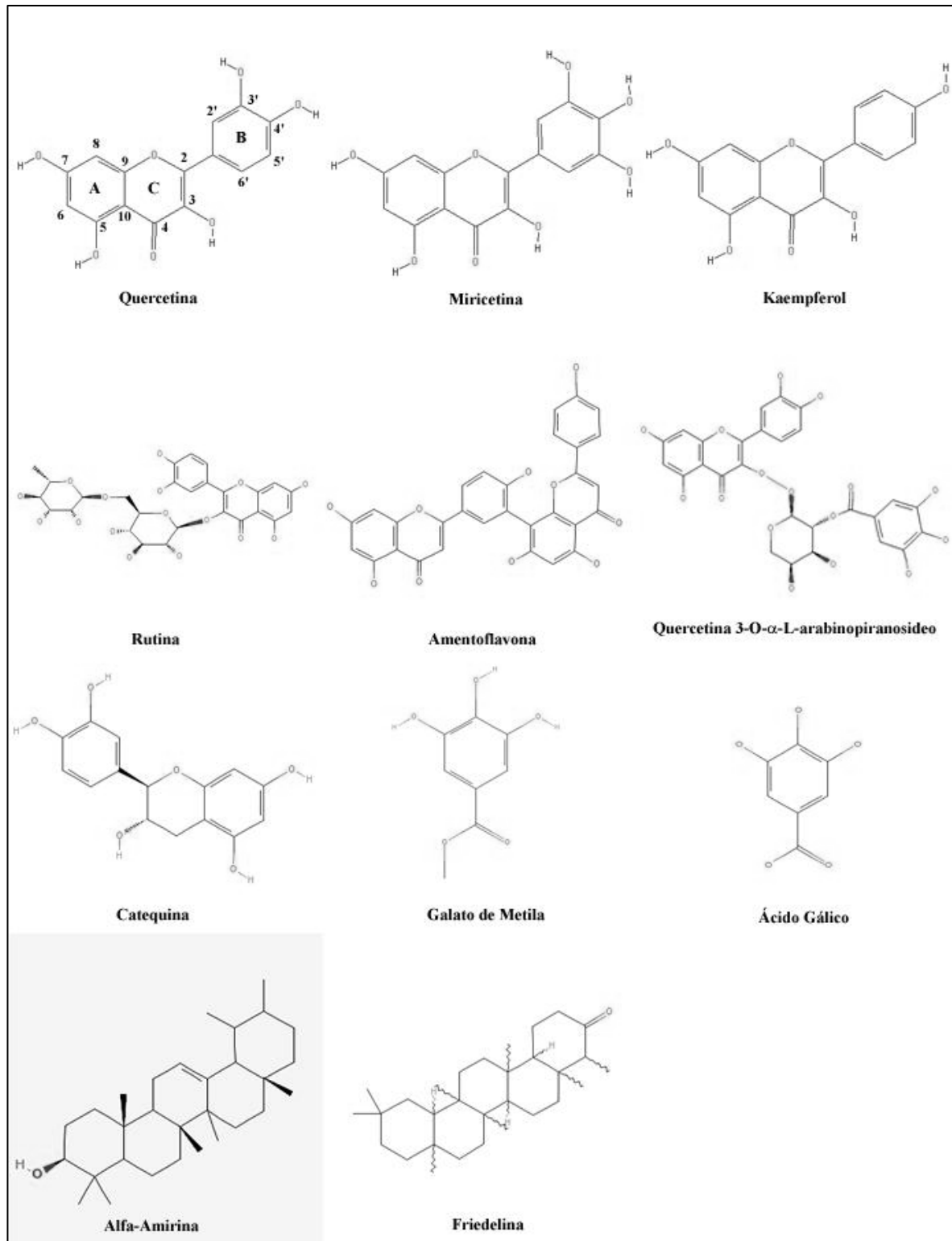


Figura 43. Algumas das substâncias identificadas nas diferentes espécies vegetais estudadas. Na molécula de quercetina está indicada a numeração do núcleo fundamental dos flavonóides.

Assim, quanto maior o número de hidroxilas presentes na molécula de um flavonóide, maior sua reatividade. Uma dupla ligação entre os carbonos 2 e 3 do anel C, associada a um grupamento ester no carbono 4, também torna a molécula mais reativa. Pelo contrário, a glicosilação, bem como a polimerização de moléculas de flavonóides, reduz sua capacidade antioxidante ou pró-oxidante.

Essas informações podem explicar a ausência de mutagenicidade dos derivados glicosilados da quercetina. Em *Alchornea* foram isolados vários derivados da quercetina com açúcares ligados ao carbono 3 do anel C da molécula da quercetina e, para aqueles avaliados quanto à mutagenicidade, não foi evidenciado um aumento na frequência de revertentes. Conforme explicitado até o momento, essa glicosilação reduz a reatividade dos flavonóides e pode explicar essa ausência de atividade mutagênica.

Ainda de acordo com Heim et al (2002), a presença de um grupamento OH no carbono 3 do anel C da estrutura do flavonóide parece ser bastante relevante para sua reatividade. Assim, como nos compostos obtidos de *Alchornea* o açúcar se encontra ligado ao carbono 3, temos a eliminação de outro fator importante, que poderia estar relacionado à mutagenicidade.

Além da quercetina e de seus derivados glicosilados, outros compostos, conforme citado anteriormente, foram isolados das plantas desse gênero. Dentre eles, o ácido gálico, que, segundo Martínez et al. (2000) é capaz de ocasionar danos oxidativos ao DNA. Porém essa atividade é perdida após a adição da fração S9.

Mas não está muito clara a relação direta da mutagenicidade observada para os extratos metanólicos das diferentes espécies de *Alchornea* com a mutagenicidade do ácido gálico, uma vez que, de acordo com Chen e Chung (2000), esse composto não demonstrou mutagenicidade através do teste de Ames.

Foi isolada também destas plantas a amentoflavona, que de acordo com nossos resultados (Tabela 12), apresentou mutagenicidade para a linhagem TA98 (-S9 / +S9). Cardoso et al. (2006) afirmam que esse composto é o responsável pela mutagenicidade observada para o extrato metanólico de *B. crassa in vitro* e, além disso, segundo Uddin et al. (2004), a amentoflavona apresenta a capacidade, quando na presença de íons Cobre, de degradar o DNA e de gerar radicais livres.

O galato de metila, também encontrado nas *Alchornea*, quando avaliado no teste de Ames não apresentou mutagenicidade, de acordo com nossos dados (Tabela 12). Esses resultados corroboram com os descritos por Martínez et al. (2000), que demonstraram que esse composto não apresenta mutagenicidade *in vitro*.

Yoshino et al. (1999) afirmam que a miricetina aglicona é capaz de ocasionar quebras no DNA. Porém, em *A. glandulosa* foi observada a presença de miricetina-3-*O*- α -L-raminopiranosídeo, o que não nos permite relacionar esse composto com a mutagenicidade observada para esse extrato.

Além da mutagenicidade *in vitro*, foi avaliado também o potencial mutagênico dos extratos metanólicos das três espécies de *Alchornea in vivo*, através do teste do micronúcleo em células do sangue periférico de camundongos. Neste ensaio os três extratos alteraram a frequência de micronúcleos em relação ao controle

negativo (Figuras 37, 38 e 39) demonstrando a presença de compostos causadores de quebras cromossômicas ou de perdas de cromossomos inteiros (aneugênese) em sua composição. Conforme afirmado anteriormente, a quercetina é capaz de ocasionar mutagenicidade *in vivo* (SILVA et al., 2002), podendo ser relacionada com a atividade observada neste estudo. Porém, nesse caso, outros compostos ou metabólitos derivados do metabolismo animal, podem estar associados à essa atividade.

Tendo em vista essas informações, podemos afirmar que os extratos metanólicos das espécies de *Alchornea* estudadas apresentam compostos capazes de causar mutagenicidade *in vitro*, causando especialmente danos do tipo *frameshift* ao DNA. Provavelmente os compostos responsáveis por essa mutagenicidade *in vitro* são a quercetina e a amentoflavona, que estão presentes nas três espécies estudadas. As diferenças interespecíficas para os resultados observados são provavelmente devido a variações nas proporções desses compostos nos diferentes extratos e até mesmo possíveis interações entre eles. Os resultados *in vivo* demonstram que os extratos apresentam também compostos com atividades clatogênica e/ou aneugênese.

5.2 *Anacardium humile*

Após a análise estatística dos resultados obtidos através dos ensaios *in vitro* com os extratos diclorometânico e metanólico das folhas de *A. humile*, não foi verificada atividade genotóxica para esses compostos (Tabela 4). Foi verificada citotoxicidade nas linhagens TA100 (-S9) e TA97a (-S9) apenas para as maiores doses empregadas do extrato metanólico.

De acordo com os estudos fitoquímicos realizados sob coordenação do Prof. Wagner Vilegas, foi verificado no extrato metanólico a presença de flavonóides e de grande quantidade de taninos. Essas duas classes de metabólitos secundários vegetais são reconhecidas tanto por propriedades benéficas quanto prejudiciais.

Os taninos, componente majoritário desse extrato vegetal, apresentam, de acordo com uma revisão de Haslam (1996), atividades antibacteriana, hepatoprotetora, inibidora da replicação de HIV, além de atividades genotóxica (LABIENIEC e GABRYELAK, 2003) e antígenotóxica (DAUER et al., 2003). Essas atividades possivelmente são decorrentes de propriedades moleculares características dessas substâncias: capacidade de complexação com macromoléculas; capacidade de complexação com íons metálicos; atuação como seqüestradores de radicais livres.

Nossos resultados demonstram que, mesmo a presença de compostos com potencial genotóxico na composição química do extrato vegetal, não representa a concretização de um efeito mutagênico. Provavelmente a interação entre esses compostos presentes no extrato é fundamental para que esse potencial se expresse concretamente ou não.

5.3 *Byrsonima basiloba*

Neste trabalho foram avaliados *in vitro* os extratos clorofórmico e metanólico de *B. basiloba*. Os resultados estão reunidos na Tabela 5. Podemos verificar, a partir desses resultados, que o extrato clorofórmico não apresentou mutagenicidade em nenhuma das linhagens utilizadas. De acordo com os estudos

fitoquímicos realizados pelo Instituto de Química, dentro do projeto temático, foram identificados nesse extrato fitoesteróides (especialmente campesterol) e α -amirina.

Os fitoesteróides, conforme já discutido anteriormente, não apresentam potencial para ocasionar danos ao DNA. O triterpenóide α -amirina não apresenta relatos de mutagenicidade descritos. Um estudo conduzido com uma mistura de triterpenóides (α -amirina e β -amirina), empregando o teste do micronúcleo em camundongos, não evidenciou atividades mutagênicas (VILLASEÑOR et al., 2004). Segundo Oliveira et al. (2005) essa mesma mistura apresenta efeitos hepatoprotetores.

Não foram encontrados estudos que creditassem atividade genotóxica aos triterpenóides. Por outro lado, vários trabalhos revelam atividades biológicas bastante promissoras para esses compostos como antimutagenicidade (RESENDE et al., 2006) e atividade antitumoral (FUKUDA et al., 2006).

Os resultados obtidos a partir dos ensaios realizados com o extrato metanólico de *B. basiloba* revelaram alterações significativas na frequência de revertentes nas linhagens TA100 (-S9) e TA97a (-S9 / +S9). Porém, a razão de mutagenicidade não foi maior que 2 e, portanto, esse extrato também não pode ser considerado mutagênico.

Essa alteração na frequência de revertentes pode ser ocasionada pela presença de compostos químicos que interagem de alguma forma com o DNA o que pode, em tratamentos sucessivos, acabar ocasionando danos mais efetivos ao material genético. Assim, os compostos com os chamados indícios de mutagenicidade podem

representar um risco ao consumo humano, especialmente em situações em que o contato com a substância ocorre de forma repetida, como nos tratamentos medicinais.

Os estudos fitoquímicos desse extrato demonstraram a presença de (+)-catequina, quercetina-3-O- α -L-arabinopiranosídeo, ácido gálico, galato de metila, e proantocianidinas. Não foi verificada atividade mutagênica para a (+)-catequina quando realizado o teste de Ames (Tabela 12), sendo isso válido também para a quercetina-3-O- α -L-arabinopiranosídeo e o galato de metila.

Esses resultados estão de acordo com a literatura, que afirma, conforme discutido anteriormente, que a quercetina glicosilada tem sua reatividade reduzida significativamente (HEIM et al., 2002), enquanto o galato de metila não apresenta potencial mutagênico (MARTÍNEZ et al., 2000). Além disso, segundo Dauer et al. (2003), a catequina causou poucos danos ao material genético de hepatócitos e apenas em altas concentrações. Martínez et al. (2000) também reforça essa informação demonstrando, em linhagens específicas de *E. coli*, que a catequina não foi capaz de ocasionar danos oxidativos.

Esses mesmos autores afirmam que o ácido gálico, também presente nesse extrato vegetal, porém não avaliado nesse estudo, apresenta a capacidade de ocasionar danos oxidativos, mas após a ativação metabólica, essa propriedade é perdida (MARTÍNEZ et al., 2000)

Foram isoladas do extrato metanólico de *B. basiloba* proantocianidinas, que são taninos condensados e, segundo Yamakoshi et al. (2002), uma fração enriquecida desses compostos, obtido das sementes de uvas, não

apresentou efeitos mutagênicos nos testes de Ames, de aberração cromossômica *in vitro* e do micronúcleo em células de camundongos. Por outro lado, de acordo com Dauer et al. (2003) uma fração de proantocianidinas obtida de *Hamamelis virginiana* causou quebras no DNA de hepatócitos, as quais foram detectadas através do teste do cometa. Porém, segundo este mesmo trabalho, essa fração de taninos apresentou também atividade antigenotóxica *in vitro*.

De acordo com Cardoso et al. (2006), o extrato metanólico obtido de *B. crassa* ocasionou alterações significativas na frequência de revertentes, indicando mutagenicidade no teste de Ames. Esses autores creditaram à amentoflavona, presente nesse extrato, a mutagenicidade observada. Porém, no extrato metanólico de *B. basiloba*, a amentoflavona não foi identificada.

Tendo em vista essas informações, podemos inferir que, apesar de não ocasionar uma mutagenicidade efetiva, o extrato metanólico de *B. basiloba* apresenta em sua composição substâncias que, num consumo prolongado, podem ocasionar danos ao DNA. Isso denota uma necessidade de cuidados com relação ao consumo exagerado de produtos derivados dessa espécie vegetal, especialmente em tratamentos de longa duração. Isso é reforçado pelo fato de que nas linhagens TA100 (+S9) e TA97a (-S9) foi observada citotoxicidade nas concentrações mais elevadas, o que também pode significar a presença de compostos nocivos.

5.4 *Mouriri pusa*

Da mesma forma que as demais espécies avaliadas nesse estudo, foram realizados ensaios de mutagenicidade *in vitro* com os extratos diclorometânico e metanólico de *M. pusa*. Para avaliação da mutagenicidade *in vivo* apenas o extrato metanólico foi avaliado.

O extrato diclorometânico de *M. pusa* não apresentou mutagenicidade em nenhuma das condições empregadas nos ensaios (Tabela 6). A análise fitoquímica desse extrato demonstrou a presença de hidrocarbonetos e isoprenóides.

Entretanto, o extrato metanólico dessa espécie vegetal foi o mais mutagênico de todos os compostos avaliados nesse trabalho (Tabela 6; Figura 28). Verificamos razões de mutagenicidade entre 2,1 e 7,4. Os índices de mutagenicidade foram mais elevados nas linhagens TA98 e TA97a, com aumento na frequência de revertentes após a ativação metabólica. Na linhagem TA100 a mutagenicidade foi verificada especialmente nas maiores concentrações. Esses resultados nos permitem inferir a existência de compostos capazes de ocasionar mutações tanto do tipo *frameshift* como por substituição de bases. Porém, os causadores de mutações *frameshift* nos parecem mais potentes ou presentes em maiores concentrações, uma vez que as maiores razões de mutagenicidade foram observadas nas linhagens TA98 e TA97a.

A análise fitoquímica desse extrato identificou a presença de taninos condensados e saponinas como compostos majoritários desse extrato. Além desses compostos foram encontrados: 4', 5, 6-triidroxi-7-metoxiflavona, kaempferol,

quercetina, miricetina, quercetina-3-*O*- α -L-arabinofuranosídeo, 6,8-diidroxikaempferol-3-*O*- β -D-galactopiranosídeo, kaempferol-3-*O*- β -D-arabinopiranosídeo, kaempferol-3-*O*- β -D-xilopiranosídeo, kaempferol-3-*O*- β -D-glicopiranosídeo, quercetina-3-*O*- β -D-glicopiranosídeo, quercetina-3-*O*- α -L-arabinopiranosídeo, quercetina-3-*O*- β -D-galactopiranosídeo, quercetina-3-*O*- β -D-rutinosídeo (rutina).

Foram realizados também ensaios de mutagenicidade com uma fração enriquecida de flavonóides obtida do extrato metanólico de *M. pusa*, onde se verificou uma elevada mutagenicidade, com valores de RM entre 2 e 10,9 (Tabela 7; Figura 29). Da mesma forma que para o extrato metanólico, a linhagem TA98 foi a mais sensível às alterações causadas, especialmente após a adição da fração S9.

Os flavonóides são reconhecidos por sua atividade antioxidante (RICE-EVANS, 2001; HEIM et al., 2002; SOOBRAATTEE et al., 2005) a qual vem sendo relacionada a outros efeitos benéficos: atividades antibacteriana, anti-inflamatória, antialérgica, antiviral, anticarcinogênica e hepatoprotetora (MIDDLETON et al., 2000). Conforme afirmado anteriormente, a atividade antioxidante dos flavonóides está diretamente relacionada à sua estrutura química, sendo um elemento bastante relevante a quantidade de hidroxilas presentes na molécula, dentre outros fatores.

Porém, apesar desses compostos terem uma atividade antioxidante bastante significativa, vários estudos vêm creditando atividades pro-oxidantes e mutagênicas aos flavonóides (RUEFF et al., 1992; SILVA et al., 2002; RIETJENS et

al., 2005). E, da mesma forma que a atividade antioxidante, os danos ocasionados por esses compostos são relacionados com a estrutura química e os elementos presentes na molécula.

Dentre os flavonóides presentes nesta espécie vegetal, três são potencialmente mais prejudiciais, podendo ser seguramente relacionados aos efeitos observados *in vitro*: a quercetina, a miricetina e o kaempferol.

A quercetina apresenta os requisitos moleculares descritos por Heim et al. (2002) como sendo relacionados com a atividade pro-oxidante:

- cinco hidroxilas, sendo duas delas no anel B, o que, de acordo com Hanasaki et al. (1994) apud Heim et al. (2002), potencializa a capacidade da molécula em originar radicais livres;
- dupla ligação entre os carbonos 2 e 3 associada a um grupamento éster no carbono 4 do anel C.

Vários autores confirmam o potencial pro-oxidante e genotóxico da quercetina em diversos ensaios biológicos (SILVA et al., 1997; SILVA et al., 2002), o que reforça a hipótese de que esse composto pode estar diretamente relacionado à mutagenicidade do extrato vegetal avaliado.

A miricetina também apresenta estudos relatando sua genotoxicidade, com efeitos mais pronunciados do que os observados para a quercetina (YOSHINO et al., 1999). Esse composto também apresenta alto potencial para causar danos oxidativos, uma vez que apresenta as mesmas características moleculares da

quercetina, com a adição de uma sexta hidroxila ao carbono 5' do anel B, o que lhe confere uma reatividade ainda maior.

O kaempferol, por si só, parece não representar riscos de danos ao DNA (SILVA et al., 1997) sendo que a mutagenicidade já descrita para esse composto é posterior à metabolização (JURADO et al., 1991). De acordo com Silva et al. (1997) o kaempferol é metabolizado em ratos pelo citocromo P450 (CYP1A1) e convertido em quercetina.

Essa informação pode ajudar a explicar o sensível aumento na mutagenicidade observada para o extrato metanólico de *M. pusa* após a ativação metabólica e reforça a relevância da quercetina na mutagenicidade observada para esse composto.

Os demais flavonóides encontrados nesse extrato provavelmente não influenciam a mutagenicidade encontrada em nosso estudo, uma vez que se tratam de flavononóides glicosilados, o que, como já afirmado anteriormente, reduz significativamente a reatividade da molécula.

Além da fração enriquecida de flavonóides, foi avaliada também uma fração enriquecida de taninos, obtida a partir do extrato metanólico de *M. pusa*. Essa fração apresentou uma mutagenicidade menos elevada que a observada para o extrato bruto e para a fração de flavonóides (Tabela 7; Figura 30). Porém, na linhagem TA100, foram observados apenas indícios de mutagenicidade e os valores de RM para a linhagem TA98 foram menores, entre 2,3 e 4,4.

Os taninos são descritos na literatura como compostos com atividades antimutagênica (DAUER et al., 2003), antioxidante (HASLAM, 1996), antitumoral (Saleem et al., 2002), dentre outras. Entretanto, esses polifenóis, da mesma forma que os flavonóides, apresentam potencial pro-oxidante (LABIENIEC et al., 2003). De acordo com esses autores, os taninos, na presença de íons metálicos, deixam de ser antioxidantes e se tornam pro-oxidantes, citotóxicos e genotóxicos. Um outro estudo demonstrou a atividade genotóxica de taninos em células de mamíferos, causando quebras de fita simples, detectadas através do teste do cometa (LABIENIEC e GABRYELAK, 2003).

Essas informações podem reforçar a idéia de que os taninos também tiveram um papel na mutagenicidade observada para o extrato de *M. pusa*. Porém, a fração estudada pode apresentar em sua composição resquícios de flavonóides, os quais podem ter participação nos danos genéticos detectados. Essa dúvida é pertinente uma vez que alguns estudos colocam os taninos como compostos não mutagênicos. Essa é uma afirmação observada em uma revisão realizada por Okuda (2005).

Uma outra informação interessante pode ser extraída de um trabalho realizado por Imanishi et al. (1991). De acordo com esses autores, os taninos obtidos do chá verde e do chá preto potencializaram os efeitos genotóxicos causados pela Mitomicina C e por radiação UV, atuando como co-mutagênicos, especialmente após ativação metabólica. A presença de resíduos de flavonóides na fração enriquecida de taninos estudada pode ter tido seus efeitos mutagênicos potencializados pelos taninos, o que pode ajudar a explicar a mutagenicidade observada.

Além da avaliação *in vitro* dos efeitos do extrato metanólico de *M. pusa*, foram realizados estudos *in vivo*. Nesse ensaio, apesar da alta mutagenicidade observada *in vitro*, o extrato vegetal não causou quebras cromossômicas. Não foi verificada qualquer alteração significativa em relação ao grupo controle negativo nos animais tratados com as diferentes doses do extrato.

Possivelmente, os compostos responsáveis pelos danos genéticos *in vitro* não foram capazes de ocasionar quebras no DNA devido ao tempo de exposição (dose única) ou ao metabolismo dos animais, que é muito mais complexo do que o proporcionado pela adição da fração S9 ao meio de cultura bacteriano. Além disso, segundo Hollman e Katan (1997) a quercetina aglicona é absorvida em menor proporção que a quercetina glicosilada. Como a quercetina glicosilada apresenta menor potencial de causar danos isso pode também explicar a ausência de mutagenicidade *in vivo*.

Sendo assim, podemos concluir que o extrato metanólico de *M. pusa* apresenta em constituição compostos capazes de ocasionar mutações do tipo *frameshift* e por substituição de bases, especialmente após a metabolização. Provavelmente os agentes mais diretamente responsáveis pela alta mutagenicidade observada são a miricetina, a quercetina e o kaempferol. Os taninos parecem de alguma forma colaborar com essa mutagenicidade, agindo como mutagênicos ou potencializando os efeitos dos flavonóides.

5.5 Gênero *Qualea*

Foram avaliadas quanto à mutagenicidade *in vitro* três diferentes espécies do gênero *Qualea* dentro do presente estudo: *Q. grandiflora*, *Q. multiflora* e *Q. parviflora*. Os resultados obtidos após os ensaios com os extratos clorofórmico e metanólico dessas plantas estão reunidos nas Tabelas 8, 9 e 10.

O extrato clorofórmico de *Q. grandiflora* se mostrou efetivamente mutagênico nas linhagens TA100 (-S9), TA97a (-S9 / +S9) e TA102 (+S9). Esses resultados indicam a presença de compostos capazes de ocasionar danos genéticos por substituição de bases e mutações do tipo *frameshift*. Além disso, esse extrato foi citotóxico nas maiores concentrações testadas para as linhagens TA97a e TA102 (-S9).

Da mesma forma, o extrato clorofórmico de *Q. multiflora* também foi mutagênico. Entretanto essa atividade só foi verificada efetivamente na linhagem TA100 (-S9 / +S9). Na linhagem TA97a (-S9) foram verificados indícios de mutagenicidade nas duas maiores concentrações e não foram evidenciados efeitos citotóxicos para esse composto.

Nos ensaios com *Q. parviflora* o extrato clorofórmico apresentou indícios de mutagenicidade para a linhagem TA97a (-S9 / +S9) e foi citotóxico na maior dose testada para a linhagem TA102 (-S9).

Os estudos fitoquímicos, realizados pelo grupo do Instituto de Química não se encontram completos com relação a esse gênero, sendo que até o

momento foram identificados no extrato clorofórmico de *Q. multiflora* ácido quínico, sitosterol e o lupeol.

Conforme já discutido em seções anteriores, os fitoesteróides não apresentam potencial mutagênico, de acordo com a literatura e, provavelmente não estão relacionados com a mutagenicidade observada para os extratos aqui avaliados. Entretanto, o ácido quínico, de acordo com Sticha et al. (1981) apresentou atividade genotóxica quando avaliado através do teste de Ames. Assim, a mutagenicidade observada no presente estudo pode estar relacionada à presença desta substância na composição química do extrato clorofórmico de *Q. multiflora*.

Porém, o fato dos estudos fitoquímicos dos extratos clorofórmicos de *Qualea* estarem incompletos dificulta uma discussão mais complexa sobre os resultados encontrados.

Com relação ao extrato metanólico de *Q. grandiflora*, foi detectada atividade mutagênica apenas para a linhagem TA100 (-S9), sendo que o mesmo ocorreu com a espécie *Q. multiflora*. Porém, para essa última foram verificados indícios de mutagenicidade nas linhagens TA98, TA97a e TA102, sempre na ausência de metabolização. O extrato metanólico de *Q. parviflora* não apresentou atividade mutagênica em nenhuma das condições empregadas, sendo, entretanto, citotóxico na maior dose testada para as linhagens TA100 e TA102 (-S9).

De acordo com os estudos fitoquímicos realizados pelo Instituto de Química, foram isolados dos extratos das três espécies de *Qualea* taninos, terpenóides e saponinas. Os taninos, conforme já discutido anteriormente, apresentam potencial

mutagênico, sendo também antimutagênico, de acordo com as condições empregadas. Já os terpenos são frequentemente não genotóxicos. As saponinas são reconhecidas por apresentarem uma série de atividades biológicas promissoras, como por exemplo atividades antitumoral, antimicrobiana e antiinflamatória (SPARG et al., 2004). De acordo com Berhow et al. (2000) uma fração de saponinas obtidas de soja não ocasionou mutagenicidade em células CHO, sendo, na verdade, antimutagênica *in vitro*.

Nos ensaios *in vivo* empregando o teste do micronúcleo apenas as espécies *Q. grandiflora* e *Q. multiflora* tiveram seus extratos metanólicos avaliados, devido aos resultados positivos obtidos no teste de Ames. O extrato metanólico de *Q. multiflora* apresentou uma pequena alteração na frequência de micronúcleos induzidos, enquanto que, para *Q. grandiflora* nenhuma alteração foi observada. Nos estudos *in vitro* verificamos que o extrato de *Q. multiflora*, além da mutagenicidade na linhagem TA100 (-S9), apresentou indícios de mutagenicidade em todas as outras linhagens. *Q. grandiflora* não apresentou esses indícios, indicando diferenças na composição química, seja em termos qualitativos ou em termos quantitativos. Possivelmente, essas diferenças também se refletiram na forma como esses produtos foram metabolizados pelos animais, sendo que, para *Q. grandiflora*, os compostos mutagênicos perderam sua atividade, enquanto que, para *Q. multiflora*, isso não ocorreu efetivamente.

A partir destes resultados verificamos que as espécies *Q. grandiflora* e *Q. multiflora* apresentaram mutagenicidade *in vitro* ocasionada tanto por seus extratos polares quanto pelos apolares. Dentre todas as espécies estudadas, apenas estas duas apresentaram extratos clorofórmicos com atividade genotóxica. A presença do ácido

quínico na composição desses extratos pode ter participado dessa atividade, porém, a falta de mais informações fitoquímicas sobre essas espécies não nos permitem elucidar melhor esse processo. Nos ensaios *in vivo* verificamos que apenas o extrato metanólico de *Q. multiflora* foi capaz de ocasionar quebras cromossômicas ou aneugênese.

5.6 *Strychnos pseudoquina*

No presente trabalho foram avaliados quanto à mutagenicidade os extratos metanólico, diclorometânico e frações enriquecidas de alcalóides e de flavonóides de *S. pseudoquina*. A discussão dos resultados obtidos pode ser visualizada no artigo já publicado e em anexo no Capítulo 2 deste trabalho:

SANTOS, F. V.; COLUS, I. M. S.; SILVA, M. A.; VILEGAS, W.; VARANDA, E. A. Assessment of DNA damage by extracts and fractions of *Strychnos pseudoquina*, a Brazilian medicinal plant with antiulcerogenic activity. **Food and Chemical Toxicology**, n. 44, p. 1585-1589, 2006.

5.7 Uma visão geral dos resultados

Por tudo que foi descrito e discutido até esse ponto, podemos verificar que a compreensão dos efeitos de um tratamento com extratos vegetais, ou mesmo frações enriquecidas, é algo muito complexo. Não se trata apenas de saber que efeitos individuais cada composto ou classe de compostos apresenta. É necessário levar em consideração que esses compostos interagem entre si e com o sistema biológico no qual são realizados os ensaios.

Foi verificado que *A. humile*, mesmo sendo rico em taninos e flavonóides, não apresentou atividade mutagênica, enquanto *M. pusa*, também rico em taninos e flavonóides, apresentou *in vitro* os maiores índices de mutagenicidade das dez espécies vegetais aqui estudadas. Entretanto, em *A. humile* foi verificada uma grande concentração de compostos derivados do ácido gálico, que apresenta certa mutagenicidade descrita, mas apenas sem metabolização (MARTÍNEZ et al., 2000), enquanto em *M. pusa* são encontrados quercetina, miricetina e kaempferol aglicona, todos eles flavonóides com elevado potencial mutagênico (JURADO et al., 1991; RIETJENS et al., 2005).

Porém, *A. glandulosa* também apresenta em sua constituição quercetina aglicona e seus índices de mutagenicidade não foram tão elevados quanto os observados para *M. pusa*. Isso pode ser decorrente da presença, em elevada quantidade, de taninos nesta última. Segundo Imanishi et al. (1991) o tratamento associado de taninos com Mitomicina C, potencializou o efeito deste composto, demonstrando que os taninos atuaram como agentes co-mutagênicos. Isso levanta a possibilidade de que pode ter havido uma interação entre os taninos e os flavonóides presentes no extrato de *M. pusa*, promovendo a elevada taxa de mutações observadas para o extrato metanólico dessa planta.

Em termos de interação entre compostos, o caso mais extremo e evidente, verificado neste trabalho, aconteceu nos estudos de mutagenicidade *in vitro* com o extrato de *S. pseudoquina* (Capítulo 2 – Artigo publicado em anexo) Nesse estudo verificou-se que o extrato metanólico, composto basicamente de alcalóides e flavonóides, apresentou mutagenicidade no Teste de Ames. Entretanto, as três frações

enriquecidas obtidas desse extrato (fração enriquecida de flavonóides, fração enriquecida de alcalóides e fração intermediária), quando avaliadas individualmente, não foram mutagênicas. Somente com a mistura das três frações, nas proporções semelhantes às observadas no extrato, é que se verificou uma alteração na frequência de revertentes. Esses resultados demonstraram que a interação entre os compostos é uma peça chave na compreensão dos efeitos ocasionados por misturas complexas, como é o caso de extratos vegetais.

Essas informações nos permitem encerrar essa discussão concluindo que o uso de plantas medicinais pode ser eficiente em alguns casos, trazendo alívio para os sintomas, ou até mesmo a cura de uma enfermidade. Porém, os riscos intrínsecos a esse consumo também são bastante elevados.

Todas as plantas aqui apresentadas apresentam indicações populares para o tratamento de uma série de doenças. Muitas delas estão tendo suas atividades biológicas comprovadas em estudos paralelos a este, dentro do projeto temático. Todavia, verificamos que, com exceção de *A. humile* e *Q. parviflora*, todas as demais espécies aqui estudadas causaram algum efeito danoso sobre o DNA. Isso reforça a importância de estudos toxicológicos mais profundos com essas plantas antes de sua recomendação (ou mesmo de seus derivados) para o uso popular.

Além disso, são necessários também estudos de mutagenicidade de longa duração, uma vez que os tratamentos medicinais humanos geralmente se utilizam de doses repetidas, por períodos prolongados. Temos como exemplo o caso de *M. pusa*, que *in vitro* foi extremamente danosa ao DNA e *in vivo* essa atividade não foi

confirmada. Possivelmente, num tratamento de longa duração com os compostos presentes nessa planta, existe um risco de que as mutações pontuais se acumulem, causando danos imprevisíveis e irreparáveis no indivíduo.

6. CONCLUSÕES

De acordo com os dados reunidos nesse trabalho podemos concluir que:

- os extratos metanólicos de *A. castaneifolia*, *A. glandulosa*, *A. triplinervia*, *M. pusa*, *Q. grandiflora*, *Q. multiflora* e *S. pseudoquina* foram mutagênicos *in vitro*, ocasionando mutações pontuais no DNA de *S. typhimurium*;
- os extratos clorofórmicos de *Q. grandiflora* e *Q. multiflora* foram mutagênicos *in vitro*;
- nos estudos *in vivo* apresentaram aumento na frequência de micronúcleos os animais tratados com os extratos metanólicos de *A. castaneifolia*, *A. glandulosa*, *A. triplinervia*, *Q. multiflora* e *S. pseudoquina*;
- não apresentaram mutagenicidade *in vitro* os extratos polares e apolares obtidos de *A. humile*, *B. basiloba* e *Q. parviflora*;
- os compostos fenólicos (flavonóides e taninos) parecem ter um papel bastante relevante na mutagenicidade dos compostos de origem vegetal;
- a interação entre os compostos químicos presentes nos extratos e frações enriquecidas é fator proeminente que deve ser levado em conta na discussão dos efeitos biológicos de produtos naturais.

Capítulo 2

1. ARTIGO PUBLICADO

Neste Capítulo será apresentado um artigo já publicado e que reúne os dados obtidos a partir dos estudos com a espécie *Strychnos pseudoquina*. Esse artigo foi submetido para publicação no periódico Food and Chemical Toxicology em janeiro de 2006, sendo aceito para publicação em março desse mesmo ano.

Esse periódico, publicado pela editora Elsevier, teve, em 2005, um índice de impacto de 2,047. Além disso, de acordo com os critérios da CAPES (2004), é classificado como Qualis Internacional A na área de Farmácia.

FOOD AND CHEMICAL TOXICOLOGY

Founding Editor

The late Leon Golberg

Editors

JOSEPH F. BORZELLECA
*Department of Pharmacology and
Toxicology, Medical College of Virginia,
Richmond, VA 23298-0613, USA*

ALAN R. BOOBIS
*Section of Experimental Medicine and Toxicology,
Division of Medicine, Imperial College, Hammersmith Campus,
Ducane Road, London W12 0NN, UK*

Review Editors

SUSAN M. BARLOW
*Harrington House, 8 Harrington Road,
Brighton, East Sussex BN1 6RE, UK*

TIMOTHY C. MARRS
*Food Standards Agency,
Aviation House, 125 Kingsway,
London WC2B 6NH, UK*

International Editorial Board

Z. APOSTOLIDES, *South Africa*
O. ARUOMA, *UK*
A. BLACK, *UK*
D. BRUSICK, *USA*
J. CALDWELL, *UK*
J. K. CHIPMAN, *UK*
S. M. COHEN, *USA*
T. F. X. COLLINS, *USA*
J. VAN DELFT, *The Netherlands*
Y. P. DRAGAN, *USA*
L. O. DRAGSTED, *Denmark*
J. G. EVANS, *UK*
L. FERGUSON, *New Zealand*
H. R. GLATT, *Germany*
W. H. GLINSMANN, *USA*
Y. HASHIMOTO, *Japan*
A. W. HAYES, *USA*
S. KACEW, *Canada*
I. KIMBER, *UK*

S. KNASMÜLLER, *Austria*
B. LAKE, *UK*
R. W. LANE, *USA*
M. I. LUSTER, *USA*
D. MCGREGOR, *UK*
H. I. MAIBACH, *USA*
B. MEIER, *Switzerland*
S. A. MILLER, *USA*
K. MORGAN, *USA*
M. PARIZA, *USA*
G. PASCAL, *France*
B. POOL-ZOBEL, *Germany*
H. E. POULSEN, *Denmark*
M. PRODANCHUK, *Ukraine*
J. J. RAFTER, *Sweden*
D. RAY, *UK*
F. REYES, *Brazil*
M. ROBERFROID, *Belgium*
I. ROWLAND, *Northern Ireland*

K. ROZMAN, *USA*
W. H. M. SARIS, *The Netherlands*
R. C. SHANK, *USA*
M. SMITH, *The Netherlands*
T. SUGIMURA, *Japan*
Y.-J. SURH, *South Korea*
S. L. TAYLOR, *USA*
J. A. THOMAS, *USA*
J. TURESKY, *Switzerland*
D. TWEATS, *UK*
H. VAINIO, *France*
E. VAVASOUR, *Canada*
H. VERHAGEN, *The Netherlands*
A. VISCONTI, *Italy*
J. H. WEISBURGER, *USA*
G. WILLIAMS, *USA*
G. WILLIAMSON, *UK*
S. YANNAI, *Israel*

© 2006 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Publication information: *Food and Chemical Toxicology* (ISSN 0278-6915). For 2006, volume 44 is scheduled for publication. Subscription prices are available upon request from the Publisher or from the Regional Sales Office nearest you or from this journal's website (<http://www.elsevier.com/locate/foodchemtox>). Further information is available on this journal and other Elsevier products through Elsevier's website (<http://www.elsevier.com>). Subscriptions are accepted on a prepaid basis only and are entered on a calendar year basis. Issues are sent by standard mail (surface within Europe, air delivery outside Europe). Priority rates are available upon request. Claims for missing issues should be made within six months of the date of dispatch.

Sponsored Supplements and/or Commercial Reprints: For more information please contact Elsevier Life Sciences Commercial Sales, Radarweg 29, 1043 NX Amsterdam, The Netherlands; phone: (+31) (20) 485 2939/2059; e-mail: LSCS@elsevier.com

Advertising information: Advertising orders and enquiries can be sent to: **USA, Canada and South America:** Mr Tino DeCarlo, The Advertising Department, Elsevier Inc., 360 Park Avenue South, New York, NY 10010-1710, USA; phone: (+1) (212) 633 3815; fax: (+1) (212) 633 3820; e-mail: t.decarlo@elsevier.com. **Europe and ROW:** Katrina Barton, Print Operations Co-ordinator, Elsevier, 84 Theobald's Road, London WC1X 8RR, UK; phone: +44 (0) 20 7611 4117; fax: +44 (0) 20 7611 4463; e-mail: k.barton@elsevier.com

USA Mailing Notice: *Food and Chemical Toxicology* (ISSN 0278-6915) is published monthly by Elsevier Ltd (The Boulevard, Langford Lane, Kidlington, Oxford OX5 1GB, UK). Annual subscription price in the USA US\$ 2740 (valid in North, Central and South America), including air speed delivery. Periodical postage rate paid at Rahway NJ and additional mailing offices.

USA POSTMASTER: Send change of address to *Food and Chemical Toxicology*, Elsevier, 6277 Sea Harbor Drive, Orlando, FL 32887-4800.

AIRFREIGHT AND MAILING in USA by Mercury International Limited, 365, Blair Road, Avenel, NJ 07001.

Assessment of DNA damage by extracts and fractions of *Strychnos pseudoquina*, a Brazilian medicinal plant with antiulcerogenic activity

F.V. Santos^a, I.M.S. Colus^b, M.A. Silva^c, W. Vilegas^c, E.A. Varanda^{a,*}

^a Department of Biological Sciences, Faculty of Pharmaceutical Sciences of Araraquara, São Paulo State University, UNESP, SP, Brazil

^b Department of General Biology, Biological Sciences Center, State University of Londrina, PR, Brazil

^c Chemical Institute of Araraquara, São Paulo State University, UNESP, SP, Brazil

Received 11 January 2006; accepted 29 March 2006

Abstract

Strychnos pseudoquina St. Hil. is a native plant of the Brazilian Savannah, used in popular medicine to treat a number of conditions. Since it contains large quantities of alkaloids with proven antiulcer activity, we tested the genotoxic potential of crude extracts and fractions containing alkaloids and flavonoids from the leaves of this plant, on *Salmonella typhimurium* and performed the micronucleus test on peripheral blood cells of mice treated in vivo. The results showed that the methanol extract of the leaves of *S. pseudoquina* is mutagenic to the TA98 (–S9) and TA100 (+S9, –S9) strains of *Salmonella*. The dichloromethane extract was not mutagenic to any of the tested strains. Fractions enriched with alkaloids or flavonoids were not mutagenic. In vivo tests were done on the crude methanol extract in albino Swiss mice, which were treated, by gavage, with three different doses of the extract. The highest dose tested (1800 mg/kg b.w.) induced micronuclei after acute treatment, confirming the mutagenic potential of the methanol extract of the leaves of *S. pseudoquina*. In high doses, constituents of *S. pseudoquina* compounds act on DNA, causing breaks and giving rise to micronuclei in the blood cells of treated animals.

© 2006 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: *Strychnos pseudoquina*; Mutagenicity; *Salmonella typhimurium*; Micronucleus; Ames test

1. Introduction

The *Strychnos* genus (Family Loganiaceae) includes about 200 plant species distributed in the tropical regions of the globe (Philippe et al., 2004; Thongphasuk et al., 2003). Many of these species are known for their medicinal potential and feature powerful poisons among their secondary metabolites. The most famous and powerful of these poisons is strychnine, one of many indole alkaloids produced by plants of this genus (Thongphasuk et al., 2003; Philippe et al., 2004).

Strychnos pseudoquina St. Hil. is a native cinchona-like tree of the Brazilian Savannah (Cerrado), popularly used for the treatment of hepatic and stomach diseases (Correa, 1926), fevers and malaria (Andrade-Neto et al., 2003). Phytochemical studies on plants of this species have demonstrated the presence of alkaloids and flavonoids (Nicoletti et al., 1984; Silva et al., 2005).

Many alkaloids are known to be genotoxic (Mori et al., 1985; Wang and Peng, 1996; Mei et al., 2004; Ansah et al., 2005). However, many of these alkaloids have also demonstrated an outstanding pharmacological potential, exhibiting antimicrobial, antiplasmodial and antitumoral activities (Frederich et al., 1999; Kingston et al., 1978). In the case of the flavonoids, despite many results indicating their pharmacological activity and potential benefit to

* Corresponding author. Tel.: +55 16 3301 6951; fax: +55 16 3301 6940.
E-mail address: varanda@fcfar.unesp.br (E.A. Varanda).

human health (Park et al., 2004; Toker et al., 2004), several are also described as mutagens (Suzuki et al., 1991; Jurado et al., 1991).

Owing to the popularity of *S. pseudoquina* as a folk medicine and the large quantity of alkaloids with proven anti-ulcer activity (Silva et al., 2005) in its leaves, we decided to evaluate the genotoxic potential of the crude extracts and fractions containing alkaloids or flavonoids from the leaves of this plant, in experiments on *Salmonella typhimurium* and the micronucleus test in peripheral blood cells of Swiss mice treated in vivo.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Dimethylsulfoxide (DMSO, CAS no. 67-68-5), methanol (CAS no. 67-56-1), dichloromethane (CAS no. 75-09-2), nicotinamide adenine dinucleotide phosphate sodium salt (CAS no. 11-84-16-3), D-glucose-6-phosphate disodium salt (CAS no. 3671-99-6), magnesium chloride (CAS no. 7786-30-3), L-histidine monohydrate (CAS no. 7048-02-4), D-biotin (CAS no. 58-85-5), Sodium azide (CAS no. 26628-22-8), 2-anthramine (CAS no. 613-13-8) and 4 nitro-*o*-phenylenediamine (CAS no. 99-56-9) were purchased from Sigma Chemical Co (St. Louis, USA). Oxoid Nutrient Broth No. 2 (Oxoid, England) and Difco Bacto Agar (Difco, USA) were used as bacterial media. D-Glucose (CAS no. 154-17-6), magnesium sulfate (CAS no. 7487-88-9), citric acid monohydrate (CAS no. 5949-29-1), potassium phosphate dibasic anhydrous (CAS no. 7758-11-4), sodium ammonium phosphate (CAS no. 13011-54-6), sodium phosphate monobasic (CAS no. 7558-80-7), sodium phosphate dibasic (CAS no. 7558-79-4), sodium chloride (CAS no. 7647-14-5) were purchased from Merck (Whitehouse Station, NJ).

2.2. Vegetable material

Leaves of *S. pseudoquina* were collected in the town of Porto Nacional (TO, Brazil) and identified by Dr. Eduardo Ribeiro dos Santos from Tocantins State University (TSU-TO, Brazil). A voucher specimen was kept at the TSU herbarium (Nr. 3291).

Leaves (300 g) were powdered and exhaustively extracted with CH₂Cl₂ and then MeOH. The solvents were evaporated in vacuo to give 13.9 g and 17.7 g of solid extract, respectively. A portion (5.0 g) of the CH₂Cl₂ extract was repeatedly fractionated by column chromatography to give lupeol, α -amirin and β -amirin, identified by comparing their NMR spectra to published data (Mahato and Kundu, 1994) and also by GC-FID analyses with authenticated standards. A portion (5.0 g) of the MeOH extract of *S. pseudoquina* was submitted to column chromatography on Sephadex LH-20 (100 × 5 cm), with MeOH as eluent. One hundred fractions (5 mL) were collected and checked by TLC on silica-gel plates, mobile phase CHCl₃–MeOH–*n*-PrOH–H₂O (5:6:1:4, v/v/v/v) developed with Dragendorff's reagent, iodoplatinate or NP/PEG (natural products/polyethyleneglycol) reagents. Alkaloids were detected in fractions 3–29 (named "alkaloid enriched fraction – AEF") and flavonoids were detected in fractions 35–90 ("flavonoid enriched fraction – FEF"). Fractions 30–35 (named "intermediate fraction – IF) contained a mixture of alkaloids, flavonoids and other unidentified compounds. A part of the AEF (69.8 mg) was further purified to afford alkaloid **1** (20 mg). The FEF (40 mg) was purified, yielding compounds **2** (9.0 mg) and **3** (7.0 mg), respectively. Compounds **1**, **2** and **3** were identified by their NMR spectra and by comparison with previous data reported in the literature (Agrawal, 1989; Harborne, 1993).

2.3. Ames mutagenicity assay

The *Salmonella* mutagenicity assay was performed using the pre-incubation method for 20–30 min (Maron and Ames, 1983) with *S.*

typhimurium strains TA100, TA98, TA97a and TA102, with and without metabolic activation. The metabolic activation mixture (S9) was freshly prepared before each test using an Aroclor-1254-induced rat-liver fraction purchased (lyophilized) from Moltax Molecular Toxicology Inc. *S. typhimurium* strains were kindly provided by Dr. B. Ames, University of California, Berkeley, CA, USA.

Five different doses of the compounds extracted from the leaves of *Strychnos pseudoquina* were evaluated in this assay. All of them were diluted in dimethylsulfoxide. The CH₂Cl₂ extract was tested in doses of 2.35, 4.70, 9.40, 14.10 and 18.8 mg/plate and the MeOH extract in doses of 3.33, 6.65, 13.3, 19.9 and 26.6 mg/plate. The AEF was evaluated in doses of 4.64, 8.38, 10.0, 13.31, 15.59 mg/plate, the FEF in doses of 1.72, 3.44, 6.88, 10.30 and 13.73 mg/plate and the IF in doses of 3.04, 6.10, 9.12 and 3.04 mg/plate. Besides testing the separate enriched fractions, we assessed the effects of possible interactions between them in TA100 strain. We tested several mixtures, including one with the approximate proportions observed in the plant (1 part flavonoids to 12 parts alkaloids). In this case we mixed 1.17 mg of FEF to 14.3 mg of AEF. Another mixture assessed was 1.37 mg of FEF, 11.1 mg of AEF and 3.0 mg of IF.

The concentrations used were based on the bacterial toxicity of each preparation, estimated in a preliminary test. In all subsequent assays, the upper limit of the dose range tested was either the highest non-toxic dose or the lowest toxic dose determined in this preliminary assay. Toxicity was apparent either as a reduction in the number of his⁺ revertants, or as an alteration in the auxotrophic background (i.e. background lawn).

Each concentration of the tested mixtures was added to 500 μ L of buffer pH 7.4 and 100 μ L of bacterial culture and then incubated at 37 °C for 20–30 min. After this time 2 mL of top agar was added and the mixture was poured on to a plate containing minimal agar. The plates were incubated at 37 °C for 48 h and the his⁺ revertant colonies were manually counted. The influence of metabolic activation was tested by adding 500 μ L of S9 mixture. All experiments were performed in triplicate.

The standard mutagens used as positive controls in experiments without S9 mix were 4-nitro-*o*-phenylenediamine (5 μ g/plate) for TA98 and TA97a, sodium azide (1.25 μ g/plate) for TA100 and daunomycin (3 μ g/plate) for TA102. 2-Anthramine (0.125 μ g/plate) was used in the experiments with metabolic activation for all strains. DMSO served as the negative (solvent) control (100 μ L/plate).

The statistical analysis was performed with the Salanal computer program, adopting the Bernstein et al. (1982) model. The mutagenic index (MI) was also calculated for each dose that is the average number of revertants per plate divided by the average number of revertants per plate of the negative (solvent) control. A sample was considered positive when MI \geq 2 for at least one of the tested doses and if the response was dose dependent (Vargas et al., 1993; Varella et al., 2004).

2.4. Micronucleus test

The animals were divided into groups of ten (5 males and 5 females) for each treatment. The animals were treated with 0.1 ml of each test solution per 10 g body weight and received water and food ad libitum between the treatment moment and the blood sampling. In view of the results obtained with the CH₂Cl₂ extract in *Salmonella* and also the low solubility of the CH₂Cl₂ extract in any of the solvents compatible with the animal treatment, only the MeOH extract of *S. pseudoquina* was evaluated by this test. This extract was assessed in three different doses: 1800, 1350 and 900 mg/kg b.w., via gavage. These doses were based in the solubility limit of the extract in distilled water and no tested dose was toxic to the animals. AEF and FEF were not evaluated in this assay because of the small amount of material available for the study.

The micronucleus test on peripheral blood cells was performed as described by Hayashi et al. (1990), who used slides pre-stained with acridine orange (CAS: 494-38-2). Glass slides were heated to about 70 °C on a hot-plate and a 10 μ L drop of an aqueous solution of the dye (1 mg/mL) was placed on each slide and spread evenly over the surface with the end of a second well-cleaned slide. Once dry, the slides were kept in the dark at room temperature for at least 24 h.

Thirty hours after the treatment of the animals with the various compounds, the blood was sampled by perforating the caudal vein of the mouse with a needle and collecting 5 μ L drops, each of which was placed at the centre of a pre-stained slide and covered with a cover-slip (24 \times 40 mm). These slides were then kept in the dark, at -20°C , for a minimum of 24 h, before cytological examination of the blood cells.

The cell preparations were examined under a fluorescence microscope (Nikon), with a blue (488 nm) excitation filter and yellow (515 nm) emission (barrier) filter, using an oil-immersion objective. Thousand reticulocytes per treated animal were analysed and the proportion of micronucleated cells counted.

A negative control group and a positive control group were established, by treating the animals with, respectively, distilled water and cyclophosphamide (40 mg/kg b.w.). Means and standard deviations were calculated and the ANOVA performed. The Tukey–Kramer test was used to compare the results obtained for treated groups with the negative control group.

3. Results

The CH_2Cl_2 extract was not mutagenic to any of the assessed strains. In contrast, the MeOH extract of the leaves of *S. pseudoquina* did show mutagenicity in strains TA98 and TA100 of *Salmonella*, especially at the highest doses tested (Table 1). After metabolic activation, TA98 did not display mutagenicity, but the extract was cytotoxic to this strain at the highest assessed concentration. A significant increase in the reversion frequency of the TA100 strain was observed, with and without addition of the S9 mixture. Strains TA97a and TA102 did not present substantial alterations in the frequency of revertant colonies.

The three fractions evaluated in this assay (AEF, FEF and IF) were not significantly mutagenic for TA98 and TA100 strains. The results obtained did not reveal increase in the revertant frequency. However, the frequency of revertants in the assay that evaluated the effects of the mixture of the fractions revealed signs of mutagenicity in TA100 strain. The mixture of the AEF and FEF (1:12) caused an increase in the frequency of revertants ($P < 0.05$,

$\text{MI} < 2$). The same was observed to the mixture of the three fractions, but statistically, the differences was larger ($P < 0.01$, $\text{MI} < 2$).

Table 2 shows that the methanol extract of *S. pseudoquina* was mutagenic in vivo, at the highest assessed concentration. The micronucleus frequency per 1000 analyzed cells being statistically altered at 1800 mg/kg b.w. from that of the negative control group ($P < 0.01$). In addition, there was no statistical difference between the results observed for males and females, demonstrating that gender differences do not modify the activity of the plant extract in the animals.

Table 2

Number of micronuclei per a thousand reticulocytes of blood of mice, mean and standard deviation, thirty hours after the treatment with different doses of the methanol extract of *Strychnos pseudoquina*, via gavage

Animals	Treatments (mg/kg b.w.)				
	CPA	Water	900	1350	1800
1	18	2	2	1	2
2	18	1	1	2	3
3	22	1	2	–	3
4	20	3	0	2	1
5	19	1	1	2	4
6	22	2	2	3	3
7	–	1	1	1	2
8	17	3	2	2	3
9	18	1	1	2	4
10	20	0	2	3	3
Mean	19.33 ^a	1.5	1.4	2	2.8 ^a
SD	1.80	0.97	0.70	0.71	0.92

CPA: positive control (50 mg/kg b.w.); water: negative control; animals 1–5: males; animals 6–10: females; SD: standard deviation.

^a Statistically different of the negative control.

Table 1

Mutagenic activity expressed as the mean and standard deviation of the number of revertants/plate in bacterial strains TA98, TA100, TA97a and TA102 exposed to the MeOH extract of *S. pseudoquina*, at various doses, with (+S9) or without (–S9) metabolic activation

Treatment (mg/plate)	Number of revertants his+/plate in <i>S. typhimurium</i>							
	TA98		TA100		TA97a		TA102	
	–S9	+S9	–S9	+S9	–S9	+S9	–S9	+S9
Control +	966 \pm 68.7 ^a	1142 \pm 76.2 ^b	1975 \pm 78.5 ^c	1620 \pm 53.9 ^b	1175 \pm 121.9 ^a	1329 \pm 78.3 ^b	2140 \pm 158.2 ^d	1372 \pm 50.2 ^b
DMSO	34.3 \pm 2.5	26.7 \pm 1.5	134.3 \pm 10.6	87.3 \pm 5.5	133.7 \pm 19.1	147.3 \pm 10.7	291.3 \pm 6.7	212.0 \pm 10.1
3.33	45.3 \pm 4.9	23.3 \pm 5.1	168.0 \pm 10.4	102.7 \pm 53.9	144.7 \pm 7.1	158.0 \pm 6.2	265.3 \pm 17.6	ND
6.66	47.3 \pm 10.1	28.7 \pm 3.5	157.3 \pm 7.8	129.0 \pm 3.6 [*]	140.7 \pm 7.6	153.3 \pm 9.0	268.5 \pm 37.5	235.7 \pm 7.0
13.30	64.0 \pm 1.7 [*]	33.3 \pm 9.5	237.0 \pm 15.6 [*]	173.0 \pm 4.6 [*]	115.7 \pm 8.1	167.0 \pm 3.0	286.7 \pm 9.6	239.7 \pm 12.2
19.95	73.0 \pm 4.4 ^{**}	39.3 \pm 7.8	258.3 \pm 25.5 [*]	188.7 \pm 3.5 ^{**}	128.0 \pm 6.0	164.3 \pm 7.0	304.0 \pm 12.1	255.3 \pm 6.7
26.60	81.3 \pm 11.2 ^{**}	cyt.	328.0 \pm 35.0 ^{**}	257.3 \pm 4.0 ^{**}	98.0 \pm 6.24	152.3 \pm 4.5	337.0 \pm 14.0	324.3 \pm 5.5

DMSO: 100 μ L/plate (negative control). Control +: Positive control.

cyt = Cytotoxic; ND: not determined.

^{*} $P \leq 0.01$.

^{**} $P \leq 0.01$ and revertants frequency twice larger than DMSO group.

^a NPD (4-nitro-*o*-phenylenediamine – 10.0 μ g/plate).

^b 2-Anthramine (1.25 μ g/plate).

^c Sodium azide (1.25 μ g/plate).

^d Daunomycin (3 μ g/plate).

4. Discussion

Plants of the genus *Strychnos* are known for their efficacy in popular medicine. Nevertheless, few studies have been performed on their biological activity. *S. pseudoquina* is a species used in Brazilian folk medicine to treat gastric and liver diseases (Correa, 1926). This species does not produce the alkaloids cinchonine or quinine but its bark is also used as a substitute for true quine in the treatment of malaria.

The phytochemical work of Delle-Monache et al. (1969) and Nicoletti et al. (1984) led to the isolation of the flavonoids isorhamnetine and strychnobiflavone, besides the alkaloids bisnordihydrotoxiferine, diabolone and 11-methoxydiabolone.

In previous work (Silva et al., 2005), we demonstrated the activity of the methanol extract of the leaves of *S. pseudoquina*, as well as of the AEF, in protecting the gastric mucosa against injuries caused by the non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID) piroxicam and necrotizing agent (HCl/EtOH) in mice. AEF exhibited higher activity than that of the whole MeOH extract and presented as main constituent the 3-hydroxy-enolate of the known indole alkaloid nordihydrofluorocurarine **1**. The structure of **1** roughly resembles that of omeprazole, a well-known antiulcer agent, making this a promising candidate for further tests in the search for novel antiulcerogenic compounds.

Although much work has been done on the pharmacological properties and chemical composition of extracts from species belonging to the genus *Strychnos*, only limited data are available in the literature concerning the genotoxicity of *S. pseudoquina* that might guarantee the safe use of this medicinal plant.

Therefore, we used in vitro (Ames test) and in vivo (micronucleus test) assays to evaluate the genotoxic properties of extracts and fractions prepared from the leaves of *S. pseudoquina*. Both assays are considered to be effective tests for this kind of evaluation (Mortelmans and Zeiger, 2000; Krishna and Hayashi, 2000).

Initially, crude CH₂Cl₂ and MeOH leaf extracts were evaluated in vitro by the Ames test at five different doses. The CH₂Cl₂ extract did not show mutagenicity in any of the bacterial strains, with or without metabolic activation. Therefore, we did not perform the in vivo assays on the CH₂Cl₂ extract. Besides, the CH₂Cl₂ extract was not soluble in any of the permissible vehicles for gavage administration to the animals.

The crude MeOH extract was not mutagenic to the TA97a and TA102 strains, but induced a significant increase in the frequency of reversions in the TA98 (frameshift mutations) and TA100 (base-substitution mutations) strains, without metabolic activation, at doses higher than 13.30 mg/plate (Table 1). After metabolic activation with S9, only TA100 strain showed a significant increase in the frequency of revertants at doses higher than 6.66 mg/plate. Therefore, these results reveal that the MeOH extract

from the leaves of *S. pseudoquina* contains compounds that cause frameshift mutations by acting directly on the DNA, as well as compounds that cause base-substitution mutations acting directly and indirectly on the DNA. Data in Table 1 indicate that, after metabolic activation, the compounds that caused reversions in the TA98 strain lost their activities, while compounds that caused reversions in the TA100 strain became more potent. Consequently, it is likely that the extract contains mutagens of at least two distinct types that cause frameshift and base substitutions.

The in vivo micronucleus tests with the MeOH extract were performed in albino Swiss mice treated with three different doses of the extract, administered by gavage. As observed in Table 2, the highest tested dose (1800 mg/kg b.w.) induced a significant increase in the frequency of micronuclei after acute treatment, confirming the mutagenic potential of the MeOH extract from leaves of *S. pseudoquina*. Therefore, in high doses, the MeOH extract acts on the DNA, causing breaks and/or loss of entire chromosomes, and giving rise to micronuclei in the blood cells of the treated animals.

In order to try to assess the possible compounds responsible for the mutations observed in the Ames test and in the micronucleus test, we fractionated the MeOH extract in three fractions: one containing alkaloids (AEF), one with flavonoids (FEF) and one containing a mixture of minor flavonoids and alkaloids (IF). The main compound in AEF was alkaloid **1**, whereas FEF contained mainly flavonoids **2** and **3**.

Several reports in the literature describe alkaloids as being mutagens and carcinogens (Wang and Peng, 1996; Fu et al., 2004; Mei et al., 2004). Nevertheless, there are also some reports describing non-mutagenic (Proudlock et al., 2004) and even anti-mutagenic alkaloids (Cernakova et al., 2002; Huynh and Teel, 2005). Flavonoids have also been found with either mutagenic or non-mutagenic properties, depending on their structure or concentration (Delaney et al., 2002).

According to the data obtained in this study, none of the enriched fractions presented significant mutagenicity. Spot tests with alkaloid **1**, using the method described by Maron and Ames (1983) with TA98 and TA100 strains (+S9, -S9), also revealed absence of mutagenicity.

Since none of the major classes of compounds contained in the MeOH extract were mutagenic when evaluated individually, we suggest that there is a possible synergistic interaction among these compounds, causing the genotoxic effects. To test this possibility, we carried out new assays using mixtures of the two major classes of these compounds (alkaloids and flavonoids). Several different proportions of FEF:AEF were tested, including a 1:12 mixture (1.17 mg of FEF: 14.3 mg of AEF), similar to that occurring in the plant. Only the TA100 strain was evaluated, since it had already revealed significant mutagenicity in the crude extract with and without metabolic activation. We observed a significant change in the frequency of reversion ($p < 0.05$), but the MI < 2.

Further experiments were performed using the TA100 strain, now including also the IF in mixtures of FEF:AEF:IF (1.37 mg of FEF + 11.1 mg of AEF + 3.0 mg of IF). In this case, once again a significant increase was observed in the number of revertants ($p < 0.01$), but $MI < 2$. This indicates that a complex interaction occurs among the different chemical classes of compounds present in *S. pseudoquina*.

The aforementioned results indicate that, since AEF and compound **1** present promising antiulcerogenic activity without signs of toxicity (Silva et al., 2005) or mutagenicity, AEF and compound **1** should be further explored as a possible source of new antiulcerogenic phytotherapeutic preparations. On other hand, the positive results in the Ames test and micronucleus for the methanolic extract of *S. pseudoquina* suggest that the indiscriminate use of home-made preparations of this plant can be dangerous to health.

Acknowledgement

We thank the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) for fundings from Biota-Fapesp Program and to Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico Tecnológico (CNPq) for a grant to W.V. and F.V.S.

References

- Agrawal, P.K., 1989, first ed. Carbon 13 NMR of Flavonoids, vol. XXXIX Elsevier, Amsterdam.
- Andrade-Neto, V.F., Brandão, M.G.L., Stehmann, J.R., Oliveira, L.A., Krettl, A.U., 2003. Antimalarial activity of *Cinchona*-like plants used to treat fever and malaria in Brazil. *J. Ethnopharmacol.* 87, 253–256.
- Ansah, C., Khan, A., Gooderham, N.J., 2005. In vitro genotoxicity of the West African anti-malarial herbal *Cryptolepis sanguinolenta* and its major alkaloid cryptolepine. *Toxicology* 208, 141–147.
- Bernstein, L., Kaldor, J., McCann, J., Pike, M.C., 1982. An empirical approach to the statistical analysis of mutagenesis data from the *Salmonella* test. *Mutat. Res.* 97, 267–281.
- Correa, P.M., 1926. Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas, first ed. vol. VI, Imprensa Oficial, Rio de Janeiro.
- Delaney, B., Phillips, K., Vasquez, C., Wilson, A., Cox, D., Wang, H.B., Manthey, J., 2002. Genetic toxicity of a standardized mixture of citrus polymethoxylated flavones. *Food Chem. Toxicol.* 40 (5), 617–624.
- Delle-Monache, F., Aldo, P.T., Bettolo, G.B.M., 1969. Occurrence of nor-dehydrotoxiferine in *Strychnos pseudoquina* St. Hil. *Tetrahedron Lett.* 25, 2009–2012.
- Frederich, M., Hayette, M.P., Tits, M., De Mol, P., Angenot, L., 1999. In vitro activities of *Strychnos* alkaloids and extracts against *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43, 2328–2331.
- Fu, P.P., Xia, Q., Lin, G., Chou, M.W., 2004. Pyrrolizidine alkaloids – genotoxicity, metabolism enzymes, metabolic activation, and mechanisms. *Drug. Metab. Rev.* 31 (1), 1–55.
- Harborne, J.B., 1993. The Flavonoids, first ed. Advances in Research Since 1986 Chapman and Hall, London.
- Hayashi, M., Morita, T., Kodama, Y., Sofuni, T., Ishidate Jr., M., 1990. The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides. *Mutat. Res.* 245, 245–249.
- Huynh, H.T., Teel, R.W., 2005. In vitro antimutagenicity of capsaicin toward heterocyclic amines in *Salmonella typhimurium* strain TA98. *Anticancer Res.* 25 (1A), 117–120.
- Jurado, J., Alejandro-Duran, E., Alonso-Moraga, A., Pueyo, C., 1991. Study on the mutagenic activity of 13 bioflavonoids with the *Salmonella* Ara test. *Mutagenesis* 6 (4), 289–295.
- Kingston, D.G., Gerhart, B.B., Ionescu, F., Mangino, M.M., Sami, S.M., 1978. Plant anticancer agents V: new bisindole alkaloids from *Tabernaemontana johnstonii* stem bark. *J. Pharm. Sci.* 67 (2), 249–251.
- Krishna, G., Hayashi, M., 2000. In vivo rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. *Mutat. Res.* 455, 155–166.
- Mahato, S.B., Kundu, A.P., 1994. ¹³C NMR Spectra of pentacyclic triterpenoids – a compilation and some salient features. *Phytochemistry* 37, 1517–1575.
- Maron, D.M., Ames, B.N., 1983. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat. Res.* 113, 173–215.
- Mei, N., Heflich, R.H., Chou, M.W., Chen, T., 2004. Mutations induced by the carcinogenic pyrrolizidine alkaloid riddelliine in the liver cII gene of transgenic big blue rats. *Chem. Res. Toxicol.* 17, 814–818.
- Mori, H., Sugie, S., Yoshimi, N., Asada, Y., Furuya, T., Williams, G.M., 1985. Genotoxicity of a variety of pyrrolizidine alkaloids in the hepatocyte primary culture-DNA repair test using rat, mouse, and hamster hepatocytes. *Cancer Res.* 45, 3125–3129.
- Mortelmans, K., Zeiger, E., 2000. The Ames *Salmonella*/Microsome mutagenicity assay. *Mutat. Res.* 455 (1–2), 29–60.
- Nicoletti, M., Goulart, M.O., Lima, R.A., Goulart, A.E., Delle Monache, F., Marini-Bettolo, G.B., 1984. Flavonoids and alkaloids from *Strychnos pseudoquina*. *J. Nat. Prod.* 47 (6), 953–957.
- Park, S., Hahm, K.B., Oh, T.Y., Jin, J.H., Choue, R., 2004. Preventive effect of the flavonoid, wogonin, against ethanol-induced gastric mucosal damage in rats. *Dig. Dis. Sci.* 49 (3), 384–394.
- Philippe, G., Angenot, L., Tits, M., Frèdèrich, M., 2004. About the toxicity of some *Strychnos* species and their alkaloids. *Toxicol.* 44, 405–416.
- Proudlock, R., Thompson, C., Longstaff, E., 2004. Examination of the potential genotoxicity of pure capsaicin in bacterial mutation, chromosome aberration, and rodent micronucleus tests. *Environ. Mol. Mutagen.* 44 (5), 441–447.
- Silva, M.A., Rafacho, B.P., Hiruma-Lima, C.A., Rocha, L.R.M., Brito, A.R.M.S., Vilegas, W., 2005. Evaluation for *Strychnos pseudoquina* St. Hil. leaves extract on gastrointestinal activity in mice. *Chem. Pharm. Bull.* 53 (8) 881–885.
- Suzuki, S., Takada, T., Sugawara, Y., Muto, T., Kominami, R., 1991. Quercetin induces recombinational mutations in cultured cells as detected by DNA fingerprinting. *Japan. J. Cancer Res.* 82 (10), 1061–1064.
- Thongphasuk, P., Suttisri, R., Bavovada, R., Verpoort, R., 2003. Alkaloids and a pimarane diterpenoid from *Strychnos vanprukii*. *Phytochemistry* 64, 897–901.
- Toker, G., Küpeli, E., Memisoglu, M., Yesilada, E., 2004. Flavonoids with antinociceptive and anti-inflammatory activities from the leaves of *Tilia argentea* (silver linden). *J. Ethnopharmacol.* 95, 393–397.
- Varella, S.D., Pozzetti, G.L., Vilegas, W., Varanda, E.A., 2004. Mutagenic activity of sweepings and pigments a household-wax factory assayed with *Salmonella typhimurium*. *Food Chemical Toxicol.* 42, 2029–2035.
- Vargas, V.M.F., Motta, V.E.P., Henriques, J.A.P., 1993. Mutagenic activity detected by the Ames test in river water the influence of petrochemical industries. *Mutat. Res.* 319, 31–45.
- Wang, C., Peng, C., 1996. The mutagenicities of alkaloids and *N*-nitrosoguvacoline from betel quid. *Mutat. Res.* 360, 165–171.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABO, K. A.; ASHIDI, J. S. Antimicrobial screening of *Bridelia micrantha*, *Alchornea cordifolia* and *Boerhavia diffusa*. **African Journal of Medicine and Medical Sciences**, v. 28, n. 3-4, p. 167-169, 1999.

AKINPELU, D. A. Antimicrobial activity of *Anacardium occidentale* bark. **Fitoterapia**, v. 72, p. 286-287, 2001.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Molecular Biology of the Cell**. New York: Garland Science, 2002.

ALEXANDER-LINDO, R. L.; MORRISON, E. Y.; NAIR, M. G. Hypoglycaemic effect of stigmast-4-en-3-one and its corresponding alcohol from the bark of *Anacardium occidentale* (cashew). **Phytotherapy Research**, v. 18, n. 5, p. 403-407, 2004.

ALMEIDA, S. P.; PROENÇA, E. C. E.; SANO, S. M.; RIBEIRO, J. F. **Cerrado: espécies vegetais úteis**. Planaltina: Embrapa, 1998.

ALVES, T. M. D. A.; SILVA, A. F.; BRANDÃO, M.; GRANDI, T. S. M.; SMÂNIA, E. D. F. A.; SMÂNIA-JÚNIOR, A.; ZANI, C. L. Biological screening of Brazilian medicinal plants. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 3, p. 367-373, 2000.

AMES, B. N. Dietary carcinogens and anticarcinogens. **Science**, v. 221, p. 1256-1264, 1983.

ANDRADE-NETO, V. F.; BRANDÃO, M. G. L.; STEHMANN, J. R.; OLIVEIRA, L. A.; KRETTLI, A. U. Antimalarial activity of cinchona-like plants used to treat fever and malaria in Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 87, p. 253-256, 2003.

ANDREO, M. A.; BALLESTEROS, K. V. R.; HIRUMA-LIMA, C. A.; ROCHA, L. R. M. D.; BRITO, A. R. M. S.; VILEGAS, W. Effect of *Mouriri pusa* extracts on experimentally induced gastric lesions in rodents: Role of endogenous sulfhydryls compounds and nitric oxide in gastroprotection. **Journal of Ethnopharmacology**, 2006. No Prelo.

ANKLI, A.; HEINRICH, M.; BORK, P.; WOLFRAM, L.; BAUERFEIND, P.; BRUN, R.; SCHMID, C.; WEISS, C.; BRUGGISSER, R.; GERTSCH, J.; WASESCHA, M.; STICHER, O. Yucatec Mayan medicinal plants: Evaluation based on indigenous uses. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 79, p. 43-52, 2002.

AWAD, A. B.; FINK, C. S. Phytosterols as anticancer dietary components: Evidence and mechanism of action. **Journal of Nutrition**, v. 130, p. 2127-2130, 2000.

AYISI, N. K.; NYADEDZOR, C. Comparative *in vitro* effects of AZT and extracts of *Ocimum gratissimum*, *Ficus polita*, *Clausena anisata*, *Alchornea cordifolia* and *Elaeophorbia drupifera* against HIV-1 and HIV-2 infections. **Antiviral Research**, v. 58, n. 1, p. 25-33, 2003.

BALACHANDRAN, P.; GOVINDARAJAN, R. Cancer - an ayurvedic perspective. **Pharmacological Research**, v. 51, p. 19-30, 2005.

BASSO, L. A.; SILVA, L. H. P.; FETT-NETO, A. G.; JUNIOR, W. F. A.; MOREIRA, I. S.; PALMA, M. S.; CALIXTO, J. B.; FILHO, S. A.; SANTOS, R. R.; SOARES, M. B. P.; SANTOS, D. S. The use of biodiversity as source of new chemical entities against defined molecular targets for treatment of malaria, tuberculosis, and T-cell mediated diseases – a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 6, p. 575-606, 2005.

BERHOW, M. A.; WAGNER, E. D.; VAUGHN, S. F.; PLEWA, M. J. Characterization and antimutagenic activity of soybean saponins. **Mutation Research**, v. 448, p. 11-22, 2000.

BERNSTEIN, L.; KALDOR, J.; MCCANN, J.; PIKE, M. C. An empirical approach to the statistical analysis of mutagenesis data from the *Salmonella* test. **Mutation Research**, v. 97, n. 4, p. 267-281, 1982.

BICALHO, B.; REZENDE, C. M. Volatile compounds of cashew apple (*Anacardium occidentale* L.). **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 56, n. 1-2, p. 35-39, 2001.

BORCHERS, A. T.; KEEN, C. L.; STERN, J. S.; GERSHWIN, M. E. Inflammation and native American Medicine: The role of botanicals. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 72, p. 339-347, 2000.

BORGES, H. B. N.; SHEPHERD, G. J. Flora e estrutura do estrato lenhoso numa comunidade de cerrado em Santo Antônio do Leverger, MT, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 28, n. 1, p. 61-74, 2005.

BRACA, A.; MENDEZ, J.; MENICHINI, F.; MORELLI, I. Constituents of *Alchornea triplinervia* (Euphorbiaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 30, p. 1109–1111, 2002.

CAI, Y.; LUO, Q.; SUN, M.; CORKE, H. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional chinese medicinal plants associated with anticancer. **Life Sciences**, v. 74, p. 2157-2184, 2004.

CALDERON, A. I.; ANGERSIOFER, C. K.; PEZZUTO, J. M.; FARNSWORTH, N. R.; FOSTER, R.; RICHARD CONDIT; GUPTA, M. P.; SOEJARTO, D. D. Forest plot as a tool to demonstrate the pharmaceutical potential of plants in a tropical forest of Panama. **Economic Botany**, v. 54, n. 3, p. 278-294, 2000.

CARDOSO, C. R. P.; CÓLUS, I. M. S.; BERNARDI, C. C.; SANNOMIYA, M.; VILEGAS, W.; VARANDA, E. A. Mutagenic activity promoted by amentoflavone and methanolic extract of *Byrsonima crassa* Niedenzu. **Toxicology**, v. 225, p. 55-63, 2006.

CAVASSAN, O. **O cerrado do estado de São Paulo**. In: **Eugen Warming e o cerrado brasileiro** – um século depois. São Paulo: Editora Unesp, 2002.

CHEN, S. C.; CHUNG, K. T. Mutagenicity and antimutagenicity studies of tannic acid and its related compounds. **Food and Chemical Toxicology**, v. 38, p. 1-5, 2000.

CHITTY, F. D. Los mangles del Hato Piñero, Estado Cojedes, Venezuela. **Acta Botánica Venezuelica**, v. 27, n. 2, p. 141-146, 2004.

CONEGERO, L. S.; IDE, R. M.; NAZARI, A. S.; SARRAGIOTTO, M. H.; FILHO, B. P. D.; NAKAMURA, C. V.; CARVALHO, J. E.; FOGGIO, M. A. Constituintes químicos de *Alchornea glandulosa* (Euphorbiaceae). **Química Nova**, v. 26, n. 6, p. 825-827, 2003.

CORRÊA, M. P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, 1974.

COUTINHO, L. M. **O bioma do cerrado**. In: **Eugen Warming e o cerrado brasileiro** – um século depois. São Paulo: Editora Unesp, 2002.

CSGMT. Micronucleus test with mouse peripheral blood erythrocytes by acridine orange supravital staining: The summary report of the 5th collaborative study by CSGMT/JEMS.MMS. **Mutation Research**, v. 278, p. 83-98, 1992.

DAUER, A.; HENSEL, A.; LHOSTE, E.; KNASMÜLLER, S.; MERSCH-SUNDERMANN. Genotoxic and antigenotoxic effects of catechin and tannins from the bark of *Hamamelis virginiana* L. In metabolically competent, human hepatoma cells (HEP G2) using single cell gel electrophoresis. **Phytochemistry**, v. 63, p. 199-207, 2003.

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

DIAS, F. L.; TAKAHASHI, C. S. Cytogenetic evaluation of the effect of aqueous extracts of the medicinal plants *Alpinia nutans* Rosc (Zingiberaceae) and *Pogostemon heyneanus* Benth (Labiatae) on wistar rats and *Allium cepa* Linn (Liliaceae) root tip cells. **Genetics and Molecular Biology**, v. 17, n. 2, p. 175-180, 1994.

DUKE, J.; VASQUEZ, R. **Amazonian ethnobotanical dictionary**. Boca Raton: CRC Press Inc., 1994.

DUNSTAN, C. A.; NOREEN, Y.; SERRANO, G.; COX, P. A.; PEREIRA, P.; BOHLIN, L. Evaluation of some Peruvian medicinal plants by prostaglandin biosynthesis and rat ear edema assays. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 57, p. 35-56, 1997.

EBI, G. C. Antimicrobial activities of *Alchornea cordifolia*. **Fitoterapia**, v. 72, n. 1, p. 69-72, 2001.

ELGORASHI, E. E.; STAFFORD, G. I.; MULHOLLAND, D.; VAN STADEN, J. Isolation of captan from *Cyrtanthus suaveolens*: Effects of pesticides on quality and safety of traditional medicine. **South African Journal of Botany**, v. 70, p. 512-514, 2004.

ELVIN-LEWIS, M. Should we be concerned about herbal remedies. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 75, p. 141-164, 2001.

ETKIN, N. L. Indigenous patterns of conserving biodiversity: Pharmacologic implications. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 63, p. 233-245, 1998.

FAROMBI, E. O.; OGUNDIPE, O. O.; UHUNWANGHO, E. S.; ADEYANJU, M. A.; MOODY, J. O. Antioxidant properties of extracts from *Alchornea laxiflora* (Benth) Pax and Hoffman. **Phytotherapy Research**, v. 17, n. 7, p. 713-716, 2003.

FUKUDA, Y.; SAKAI, K.; MATSUNAGA, S.; TOKUDA, H.; TANAKA, R. Cancer chemopreventive effect of orally administrated lupane-type triterpenoid on ultraviolet light b induced photocarcinogenesis of hairless mouse. **Cancer Letters**, v. 240, p. 94-102, 2006.

GASPAR, J.; LAIRES, A.; MONTEIRO, M.; LAUREANO, O.; RAMOS, E.; RUEFF, J. Quercetin and the mutagenicity of wines. **Mutagenesis**, v. 8, n. 1, p. 51-55, 1993.

GASPI, F. O. G.; FOGLIO, M. A.; CARVALHO, J. E.; MORENO, R. A. Pharmacological activities investigation of crude extracts and fractions from *Qualea grandiflora* Mart. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 107, p. 19-24, 2006.

GEBHART, E. Anticlastogenicity in cultured mammalian cells. **Mutation Research**, v. 267, p. 211-220, 1992.

GOMES, B. Z.; MARTINS, F. R.; TAMASHIRO, J. Y. Estrutura do cerradão e da transição entre cerradão e floresta paludícola num fragmento da International Paper do Brasil Ltda., em Brotas, SP. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 27, n. 2, p. 249-262, 2004.

GRAWÉ, J.; BRAMSSON-ZETTERBERG, L.; ZETTERBERG, G. Low dose effects of chemicals as assessed by the flow cytometric *in vivo* micronucleus assay. **Mutation Research**, v. 405, p. 199-208, 1998.

HASHIMOTO, K.; YANAGISAWA, T.; OKUI, Y.; IKEYA, Y.; MARUNO, M.; FUJITA, T. Studies on anti-allergic components in the roots of *Asiasarum sieboldi*. **Planta Medica**, v. 60, n. 2, p. 124-127, 1994.

HASLAM, E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: Possible modes of action. **Journal of Natural Products**, v. 59, p. 205-215, 1996.

HAYASHI, M.; MORITA, T.; KODAMA, Y.; SOFUNI, T.; ISHIDATE JR, M. The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides. **Mutation Research**, v. 245, p. 245-249, 1990.

HAYATSU, H.; ARIMOTO, S.; NEGISHI, T. Dietary inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. **Mutation Research**, v. 202, p. 429 – 446, 1988.

HEDDLE, J. A.; HITE, M.; KIRHART, B.; MACGREGOR, J. T.; NEWELL, G. W.; SALAMONE, M. F. The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. **Mutation Research**, v. 123, p. 61-118, 1983.

HEIM, K. E.; TAGLIAFERRO, A. R.; BOBILYA, D. J. Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 13, p. 572–584, 2002.

HIRUMA-LIMA, C. A.; SANTOS, L. C.; KUSHIMA, H.; PELLIZZON, C. H.; SILVEIRA, G. G.; VASCONCELOS, P. C. P.; VILEGAS, W.; BRITO, A. R. M. S.

Qualea grandiflora, a Brazilian “Cerrado” medicinal plant presents an important antiulcer activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 104, p. 207-214, 2006.

HOLLMAN, P. C. H.; KATAN, M. B. Absorption, metabolism and health effects of dietary flavonoids in man. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 51, n. 8, p. 305-310, 1997.

HONGPING, D.; JIANLIN, L.; MEIBIAN, Z.; WEIC, W.; LIFEN, J.; SHIJIE, C.; WEI, Z.; BAOHONGA, W.; JILIANG, H. Detecting the cytogenetic effects in workers occupationally exposed to Vincristine with four genetic tests. **Mutation Research**, 2006. No Prelo.

HOYOS, L. S.; CARVAJAL, S.; SOLANO, L.; RODRIGUEZ, J.; OROZCO, L.; LÓPEZ, Y.; AU, W. W. Cytogenetic monitoring of farmers exposed to pesticides in Colombia. **Environmental Health Perspectives**, v. 104, p. 535-538, 1996.

IMANISHI, H.; SASAKI, Y. F.; OHTA, T.; WATANABE, M.; KATO, T.; SHIRASU, Y. Tea tannin components modify the induction of Sister-Chromatid Exchanges and Chromosome Aberrations in mutagen-treated cultured mammalian cells and mice. **Mutation Research**, v. 259, n. 1, p. 79-87, 1991.

JAINU, M.; DEVI, C. S. S. Antiulcerogenic and ulcer healing effects of *Solanum nigrum* (L.) on experimental ulcer models: Possible mechanism for the inhibition of acid formation. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 104, p. 156–163, 2006.

JEPSON, W. A disappearing biome? Reconsidering land-cover change in the brazilian savanna. **The Geographical Journal**, v. 171, n. 2, p. 99–111, 2005.

JOLY, A. B. **Botânica**: Introdução à taxonomia vegetal. Rio de Janeiro: Companhia Editora Nacional, 1975.

JURADO, J.; ALEJANDRE-DURÁN, E.; ALONSO-MORAGA, A.; PUEYO, C. Study on the mutagenic activitiy of 13 bioflavonoids with the *Salmonella* ara test. **Mutagenesis**, v. 6, n. 4, p. 289-295, 1991.

KISHI, M.; HORIGUCHI, Y.; WATANABE, S.; HAYASHI, M. Validation of the mouse peripheral blood micronucleus assay using acridine orange supravital staining with urethane. **Mutation Research**, v. 278, p. 205-208, 1992.

KRISHNA, G.; HAYASHI, M. In vivo rodent micronucleus assay: Protocol, conduct and data interpretation. . **Mutation Research**, v. 455, p. 155-166, 2000.

KRITCHEVSKY, D.; CHEN, S. C. Phytosterols - health benefits and potential concerns: A review. **Nutrition Research**, v. 25, p. 413-428, 2005.

KURODA, Y.; JAIN, A. K.; TEZUKA, H.; T., K. Antimutagenicity in cultured mammalian cells. **Mutation Research**, v. 267, p. 201-209, 1992.

LABIENIEC, M.; GABRYELAK, T. Effects of tannins on chinese hamster cell line b14. **Mutation Research**, v. 539, p. 127-135, 2003.

LABIENIEC, M.; GABRYELAK, T.; FALCIONI, G. Antioxidant and pro-oxidant effects of tannins in digestive cells of the freshwater mussel *unio tumidus*. **Mutation Research**, v. 539, p. 19-28, 2003.

LAMIKANRA, A.; OGUNDAINI, A. O.; OGUNGBAMILA, F. O. Antibacterial constituents of *Alchornea cordifolia* leaves. **Phytotherapy Research**, v. 4, n. 5, p. 198-200, 1990.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L. E.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica**. Porto Alegre: ArtMed, 1995.

LEWIN, B. **Genes VII**. Porto Alegre: Artmed, 2001.

LI, W. L.; ZHENG, H. C.; BUKURU, J.; KIMPE, N. D. Natural medicines used in the traditional chinese medical system for therapy of diabetes mellitus. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 92, p. 1-21, 2004.

LIGHT, M. E.; SPARG, S. G.; STAFFORD, G. I.; STADEN, J. V. Riding the wave: South Africa's contribution to ethnopharmacological research over the last 25 years. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 127-130, 2005.

LIOI, M. B.; SCARFI, M. R.; SANTORO, A.; BARBIERI, R.; ZENI, O.; SALVEMINI, F.; BERARDINO, D.; URSINI, M. V. Cytogenetic damage and induction of pro-oxidant state in human lymphocytes exposed *in vitro* to glyphosate,

vinclozolin, atrazine and dpx-e9636. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 32, p. 39-46, 1998.

LIU, M.; OHUCHI, T.; LEIRI, T.; OHE, M.; MATSUZAKI, S. Shikonin has potent antibacterial activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (Mrsa). **Dokkyo Journal of Medical Sciences**, v. 23, p. 63-69, 1996.

LOPES, F. C. M.; CALVO, T. R.; VILEGAS, W.; CARLOS, I. Z. Inhibition of hydrogen peroxide, nitric oxide and TNF- α production in peritoneal macrophages by ethyl acetate fraction from *Alchornea glandulosa*. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 28, n. 9, p. 1726-1730, 2005.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002.

MACGREGOR, J. T. **Mutagenic and carcinogenic effects of flavonoids**. New York: Alan R. Liss, 1983.

MACHADO, R. B., NETO, M. B. R., PEREIRA, P. G. P., CALDAS, E. F., GONÇALVES, D. A., SANTOS, N. S., TABOR, K. e STEININGER, M. Estimativas de perda da área do Cerrado brasileiro. Relatório Técnico não publicado: Conservação Internacional, Brasília, 2004. Disponível em: <http://www.conservation.org.br/arquivos/RelatDesmatamCerrado.pdf>. Acesso em: 19 de Janeiro de 2006.

MACIEL, M. A. M., PINTO, A. C., BRABO, S. N., ARRUDA, A. C. Estudo da variação dos teores de terpenóides bioativos isolados das cascas de *Croton cajucara*, nativos e cultivados no estado do Pará. **Revista Universidade Rural, Série Ciências Exata e da Terra** v. 20, p. 17-34, 1998

MAJER, B. J.; LAKY, B.; KNASMÜLLER, S.; KASSIE, F. Use of the Micronucleus Assay with exfoliated epithelial cells as a biomarker for monitoring individuals at elevated risk of genetic damage and in chemoprevention trials. **Mutation Research**, v. 489, p. 147-172, 2001.

MARON, D. M.; AMES, B. N. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. **Mutation Research**, v. 113, n. 3-4, p. 173-215, 1983.

MARQUES, R. C. P.; MEDEIROS, S. R. B.; DIAS, C. S.; BARBOSA-FILHO, J. M.; AGNEZ-LIMA, L. F. Evaluation of the mutagenic potential of yangambin and of the hydroalcoholic extract of *Ocotea duckei* by the Ames Test. **Mutation Research**, v. 536, p. 117-120, 2003.

MARQUEZ, C.; VILLALOBOS, C.; POBLETE, S.; VILLALOBOS, E.; DE LOS ANGELES GARCIA, M.; DUK, S. Cytogenetic damage in female Chilean agricultural workers exposed to mixtures of pesticides. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 45, n. 1, p. 1-7, 2005.

MARRIS, E. The forgotten ecosystem. **Nature**, v. 437, p. 944-945, 2005.

MARTÍNEZ-VÁZQUEZ, M.; GONZÁLEZ-ESQUINCA, A. R.; LUNA, L. C.; GUTIÉRREZ, M. N. M.; GARCÍA-ARGÁEZ, A. N. Antimicrobial activity of *Byrsonima crassifolia* (L.) H.B.K. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 66, p. 79-82, 1999.

MARTÍNEZ, A.; URIOS, A.; BLANCO, M. Mutagenicity of 80 chemicals in *Escherichia coli* tester strains IC203, deficient in oxyR, and its oxyRQ parent WP2 *uvra/pkm101*: Detection of 31 oxidative mutagens. **Mutation Research**, v. 467, p. 41-53, 2000.

MELO-CAVALCANTE, A. A.; RUBENSAM, G.; PICADA, J. N.; GOMES-DASILVA, E.; MOREIRA, J. C. F.; HENRIQUES, J. A. Mutagenicity, antioxidant potential, and antimutagenic activity against hydrogen peroxide of cashew (*anacardium occidentale*) apple juice and cajuína. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 41, n. 5, p. 360-369, 2003.

MIDDLETON, E.; KANDASWAMI, C.; THEOHARIDES, T. C. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: Implications for inflammation, heart disease, and cancer. **PHARMACOLOGICAL REVIEWS**, v. 52, n. 4, p. 673-751, 2000.

MOFFAT, A. S. South American landscapes: Ancient and modern. **Science**, v. 296, p. 1959-1960, 2002.

MORTELMANS, K.; ZEIGER, E. The Ames *Salmonella*/Microsome Mutagenicity Assay. **Mutation Research**, v. 455, p. 29-60, 2000.

MUELLER, M. S.; RUNYAMBO, N.; WAGNER, I.; BORRMANN, S.; DIETZE, K.; HEIDEC, L. Randomized controlled trial of a traditional preparation of *Artemisia annua* L. (annual wormwood) in the treatment of malaria. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 98, p. 318-321, 2004.

MUKHERJEE, P. K.; MAITI, K.; MUKHERJEE, K.; HOUGHTON, P. J. Leads from Indian medicinal plants with hypoglycemic potentials. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 106, p. 1-28, 2006.

MUNÕS, V.; SAUVAIN, M.; BOURDY, G.; CALLAPA, J.; BERGERON, S.; ROJAS, I.; BRAVO, J. A.; BALDERRAMA, L.; ORTIZ, B.; GIMENE, A.; DEHARO, E. A search for natural bioactive compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach Part I. Evaluation of the antimalarial activity of plants used by the Chacobo Indians. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 69, p. 127-137, 2000.

MURTHY, S. S. N. Chemical examination of *Anacardium occidentale* - isolation and structure determination of a novel biflavonoid-c-glycoside. **Planta Medica**, v. 45, p. 3-10, 1982.

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

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. The influence of natural products upon drug discovery. **Natural Product Reports**, v. 17, p. 215-234, 2000.

OKUDA, T. Systematics and health effects of chemically distinct tannins in medicinal plants. **Phytochemistry**, v. 66, p. 2012-2031, 2005.

OLAJIDE, O. A.; ADEROGBA, M. A.; ADEDAPO, A. D. A.; MAKINDE, J. M. Effects of *Anacardium occidentale* stem bark extract on *in vivo* inflammatory models. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 95, p. 139-142, 2004.

OLIVEIRA, F. A.; CHAVES, M. H.; ALMEIDA, F. R. C.; LIMA-JR., R. C. P.; SILVA, R. M.; MAIA, J. L.; BRITO, G. A. A. C.; SANTOS, F. A.; RAO, V. S. Protective effect of alpha and beta-amyrin, a triterpene mixture from *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. trunk wood resin, against acetaminophen-induced liver injury in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 98, p. 103-108, 2005.

ONG, T.; WHONG, W.; STEWART, J.; BROCKMAN, H. E. Chlorophyllin: A potent antimutagen against environmental and dietary complex mixtures. **Mutation Research**, v. 173, p. 111-115, 1986.

OSADEBE, P. O.; OKOYE, E. C. Anti-inflammatory effects of crude methanolic extract and fractions of *Alchornea cordifolia*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 89, p. 19-24, 2003.

PARAMASHIVAPPA, R.; KUMAR, P. P.; VITHAYATHIL, P. J.; RAO, A. S. Novel method for isolation of major phenolic constituents from cashew (*Anacardium occidentale* L.) nut shell liquid. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 5, p. 2548-2551, 2001.

PEÑA, L. F. M.; MESQUITA, S. F. P.; CÓLUS, I. M. S. Evaluation of the genotoxicity and fetal toxicity of the herbicide Paraquat. **Acta Scientiarum**, v. 21, n. 2, p. 219-223, 1999.

PEREIRA-SILVA, E. F. L.; SANTOS, J. E.; KAGEYAMA, P. Y.; HARDT, E. Florística e fitossociologia dos estratos arbustivo e arbóreo de um remanescente de cerrado em um unidade de conservação do estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 27, n. 3, p. 533-544, 2004.

RAMEL, C.; ALEKPEROV, U. K.; AMES, B. N.; KADA, T.; WATTENBERG, L. W. Inhibitors of mutagenesis and their relevance to carcinogenesis. **Mutation Research**, v. 168, p. 47-65, 1986.

RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v. 39, p. 603-613, 2001.

RESENDE, F. A.; BARCALA, C. A. M. A.; FARIA, M. C. S.; KATO, F. H.; CUNHA, W. R.; TAVARES, D. C. Antimutagenicity of ursolic acid and oleanolic acid against doxorubicin-induced clastogenesis in balb/c mice. **Life Sciences**, v. 79, p. 1268-1273, 2006.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 20, n. 7, p. 933-956, 1996.

RICE-EVANS, C. Flavonoid antioxidants. **Current Medicinal Chemistry**, v. 8, n. 7, p. 797-807, 2001.

RIETJENS, I. M. C. M.; BOERSMA, M. G.; VAN-DER-WOUDE, H.; JEURISSEN, S. M. F.; SCHUTTE, M. E.; ALINK, G. M. Flavonoids and alkenylbenzenes: Mechanisms of mutagenic action and carcinogenic risk. **Mutation Research**, v. 574, p. 124-138, 2005.

RUEFF, J.; LAIRES, A.; GASPAR, J.; BORBA, H.; RODRIGUES, A. Oxygen species and the genotoxicity of quercetin. **Mutation Research**, v. 265, p. 75-81, 1992.

SALEEM, A.; HUSHEEM, M.; HARKONEN, P.; PIHLAJA, K. Inhibition of cancer cell growth by crude extract and the phenolics of *Terminalia chebula* Retz. Fruit. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 81, p. 327-336, 2002.

SANNOMIYA, M.; FONSECA, V. B.; SILVA, M. A. D.; ROCHA, L. R. M.; SANTOS, L. C. D.; HIRUMA-LIMA, C. A.; BRITO, A. R. M. S.; VILEGAS, W. Flavonoids and antiulcerogenic activity from *Byrsonima crassa* leaves extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, p. 1-6, 2005.

SCARTEZZINI, P.; ANTOGNONI, F.; RAGGI, M. A.; POLI, F.; SABBIONI, C. Vitamin C content and antioxidant activity of the fruit and of the Ayurvedic preparation of *Embllica officinalis* Gaertn. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 104, p. 113-118, 2006.

SCHWONTKOWSKI, D. **Herbs of the amazon:** traditional and common uses. Utah: Science Student Brain Trust Publishing, 1993.

SEO, K.Y.; JELINSKY, S. A.; LOECHLER, E. L. Factors that influence the mutagenic patterns of DNA adducts from chemical carcinogens. **Mutation Research**, v. 463, p. 215–246, 2000.

SETZER, W. N.; SHEN, X.; BATES, R. B.; BURNS, J. R.; MCCLURE, K. J.; ZHANG, P.; MORIARITY, D. M.; LAWTON, R. O. A phytochemical investigation of *Alchornea latifolia*. **Fitoterapia**, v. 71, n. 2, p. 195-198, 2000.

SHIN, G. Rapid identification of cytotoxic alkenyl catechols in *Semecarpus anacardium* using bioassay-linked High Performance Liquid Chromatography-

Electrospray/Mass Spectrometric Analysis. **Phytochemical Analysis**, v. 10, p. 208-212, 1999.

SILVA, I. D.; RODRIGUES, A. S.; GASPAR, J.; MAIA, R.; LAIRES, A.; RUEFF, J. Involvement of rat cytochrome 1A1 in the biotransformation of kaempferol to quercetin: Relevance to the genotoxicity of kaempferol. **Mutagenesis**, v. 12, n. 5, p. 383-390, 1997.

SILVA, J. D.; HERRMANN, S. M.; HEUSER, V.; PERES, W.; MARRONID, N. P.; GONZÁLEZ-GALLEGO, J.; ERDTMANN, B. Evaluation of the genotoxic effect of rutin and quercetin by comet assay and micronucleus test. **Food and Chemical Toxicology**, v. 40, p. 941-947, 2002.

SILVA, M. A. D.; RAFACHO, B. P. M.; HIRUMA-LIMA, C. A.; ROCHA, L. R. M. D.; SANTOS, L. C. D.; SANNOMIYA, M.; SOUZA-BRITO, A. R. M.; VILEGAS, W. Evaluation of *Strychnos pseudoquina* St. Hil. Leaves extract on gastrointestinal activity in mice. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 53, n. 8, p. 881-885, 2005.

SINGH, D.; AGGARWAL, A.; MATHIAS, A.; NAIK, S. Immunomodulatory activity of *Semecarpus anacardium* extract in mononuclear cells of normal individuals and rheumatoid arthritis patients. **Journal of Ethnopharmacology**, 2006. No Prelo.

SLESINSKI, R. S.; GUZZIE, P. J. **Review of recent advances in the development and application of the micronucleus test.** In: BALLANTYNE, B. **Perspectives in basic and applied toxicology.** London: John Wriqth, 1988.

SMIT, H. F.; WOERDENBAG, H. J.; SINGH, R. H.; MEULENBELD, G. J.; LABADIE, R. P.; ZWAVING, J. H. Ayurvedic herbal drugs with possible cytostatic activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 47, p. 75-84, 1995.

SOOBRAATTE, M. A.; NEERGHEEN, V. S.; LUXIMON-RAMMA, A.; ARUOMA, O. I.; BAHORUN, T. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: mechanism and actions. **Mutation Research**, v. 579, p. 200-213, 2005.

SOUZA, C. P.; AZEVEDO, M. L.; LOPES, J. L.; SARTI, S. J.; SANTOS-FILHO, D.; LOPES, J. N.; VICHNEWSKI, W.; NASI, A. M.; LEITAO-FILHO, H. F. Chemoprophylaxis of schistosomiasis: Molluscacidal activity of natural products--assays with adult snails and oviposition. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 56, n. 3, p. 333-338, 1984.

SPARG, S. G.; LIGHT, M. E.; STADEN, J. V. Biological activities and distribution of plant saponins. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 94, p. 219-243, 2004.

STICHA, H. F.; ROSINA, M. P.; WUB, C. H.; POWRIE, W. D. A comparative genotoxicity study of chlorogenic acid (3-o-caffeoylquinic acid) **Mutation Research**, v. 90, n. 3, p. 201-212, 1981.

SURRALLÉS, J.; NATARAJAN, A. T. Human lymphocytes Micronucleus Assay in Europe. An international survey. **Mutation Research**, v. 392, p. 165-174, 1997.

TAYLOR, J. L. S.; ELGORASHI, E. E.; MAES, A.; GORP, U. V.; KIMPE, N. D.; STADEN, J. V.; VERSCHAEVE, L. Investigating the safety of plants used in South African traditional medicine: Testing for genotoxicity in the micronucleus and alkaline comet assays. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 42, p. 144-154, 2003.

THONGPHASUK, P.; SUTTISRIA, R.; BAVOVADA, R.; VERPOORTE, R. Antioxidant lignan glucosides from *Strychnos vanprukii*. **Fitoterapia**, v. 75, p. 623-628, 2004.

TUCKER, J. D.; PRESTON, R. J. Chromosome Aberrations, Micronuclei, Aneuploidy, Sister Chromatid Exchanges and cancer risk assessment. **Mutation Research**, v. 365, p. 147-159, 1996.

UDDIN, Q.; MALIK, A.; AZAM, S.; HADI, N.; AZMI, A. S.; PARVEEN, N.; KHAN, N. U.; HADI, S. M. The biflavonoid, amentoflavone degrades DNA in the presence of copper ions. **Toxicology in Vitro**, v. 18, p. 435-440, 2004.

UMBUZEIRO, G. A.; VARGAS, V. M. F. **Teste de mutagenicidade com *Salmonella typhimurium* (Teste de Ames) como indicador de carcinogenicidade**

em potencial para mamíferos. In: RIBEIRO, L. R. ; SALVADORI, D. M. F. ;MARQUES, E. **Mutagênese Ambiental.** Canoas: Editora da Ulbra, 2003.

VAN GOETHEM, F.; LISON, D.; KIRSCH-VOLDERS, M. Comparative evaluation of the *in vitro* Micronucleus Test and the Alkaline Single Cell Gel Electrophoresis Assay for the detection of DNA damaging agents: Genotoxic effects of cobalt powder, tungsten carbide and cobalt-tungsten carbide. **Mutation Research**, v. 391, p. 31-43, 1997.

VILLASEÑOR, I. M.; CANLAS, A. P.; FAUSTINO, K. M.; PLANA, K. G. Evaluation of the bioactivity of triterpene mixture isolated from *Carmona retusa* (Vahl.) Masam leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 92, p. 53-56, 2004.

WANG, R.-R.; GU, Q.; YANG, L.-M.; CHEN, J.-J.; LI, S.-Y.; ZHENG, Y.-T. Anti-HIV-1 activities of extracts from the medicinal plant *Rhus chinensis*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 105, p. 269-273, 2006.

WATTEMBERG, L. W. Inhibition of neoplasia by dietary constituents. **Cancer Research**, v. 43, p. 2448-2453, 1983.

WEISBURGER, J. H. Eat to live, not live to eat. **Nutrition**, v. 16, p. 767-773, 2000.

WOLFREYS, A. M.; HEPBURN, P. A. Safety evaluation of phytosterol esters. Part 7. Assessment of mutagenic activity of phytosterols, phytosterol esters and the

cholesterol derivative, 4-cholesten-3-one. **Food and Chemical Toxicology**, v. 40, p. 461-470, 2002.

WONG, C. C.; LI, H. B.; CHENG, K. W.; CHEN, F. A systematic survey of antioxidant activity of 30 Chinese medicinal plants using the ferric reducing antioxidant power assay. **Food Chemistry**, v. 97, p. 705-711, 2006.

WONG, R.; SAGAR, C. M.; SAGAR, S. M. Integration of Chinese medicine into supportive cancer care: A modern role for an ancient tradition. **Cancer Treatment Reviews**, v. 27, p. 235–246, 2001.

YAMAKOSHI, J.; SAITO, M.; KATAOKA, S.; KIKUCHI, M. Safety evaluation of proanthocyanidin-rich extract from grape seeds. **Food and Chemical Toxicology**, v. 40, p. 599-607, 2002.

YONG, L.; LING, Y. Early metabolism evaluation making traditional Chinese medicine effective and safe therapeutics. **Journal of Zhejiang University**, v. 7, n. 2, p. 99-106, 2006.

YOSHINO, M.; HANEDA, M.; NARUSE, M.; MURAKAMI, K. Prooxidant activity of flavonoids: Copper-dependent strand breaks and the formation of 8-hydroxy-2-deoxyguanosine in DNA. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 68, p. 468-472, 1999.

ZAHA, A. **Biología molecular básica**. Porto Alegre: Mercado Aberto, 1996.

ZEIGER, E. Mutagens that are not carcinogens: Faulty theory or fault tests?

Mutation Research, v. 492, p. 29-38, 2001.

REFERÊNCIAS DAS IMAGENS

Figura 3 - <http://fm2.fieldmuseum.org/plantguides/view.asp?checkbox=2894>

Figura 4 - <http://fm2.fieldmuseum.org/plantguides/view.asp?checkbox=2900>

Figura 5 - <http://fm2.fieldmuseum.org/plantguides/view.asp?checkbox=2912>

Figura 7 - http://www.ville-ge.ch/cjb/BotSyst/APG2/Rosid_2/100_MLP_30.jpg

Figura 9 - <http://www.arvores.brasil.nom.br/cerrd/pterra4.jpg>

Figura 10- www.ibb.unesp.br/pesquisa/projeto/biota/fotobiota/exsicata/ex2244.jpg

Figura 11 - <http://www.aipa.org.br/156urt/Qualea-parviflora-andrea.jpg>

Figura 12 - http://www.serracanastra.com.br/sabermals/quina_campo.jpg