

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Área de concentração: Mutagênese

CÁSSIA REGINA PRIMILA CARDOSO

**“AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOLÓGICO DE PLANTAS
PERTENCENTES AO CERRADO BRASILEIRO E SEUS
COMPOSTOS DE INTERESSE FARMACOLÓGICO”**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” (UNESP) como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia.

ORIENTADORA: Prof.^a Dr.^a Eliana Aparecida Varanda

ARARAQUARA
2009

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

C268a Cardoso, Cássia Regina Primila
 Avaliação do potencial biológico de plantas pertencentes ao cerrado brasileiro e seus compostos de interesse farmacológico. / Cássia Regina Primila Cardoso. – Araraquara, 2009.
 161 f.

 Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia
 Orientador: Eliana Aparecida Varanda

 1. Mutagenicidade. 2 Atividade estrogênica. 3. Byrsonima. I. Varanda, Eliana Aparecida, orient. II. Título.

CAPES: 40300005

*Aos meus pais,
Júlio e Maria Aparecida*

*À minha irmã,
Ana Paula*

*Aos meus sobrinhos,
Philippe e Raphael*

*A uma pessoa especial em minha vida,
Mauro...*

A todos os meus amigos e pessoas queridas...

*Por todo o apoio, carinho, compreensão e estímulo no decorrer desta
jornada.*

Deus, obrigada...

*Por estas mãos, que são minhas.
Alavancas da ação, do progresso, da redenção.*

*Agradeço pelas mãos que acenam adeuses,
Pelas mãos que fazem ternura,
e que socorrem na amargura...
Pelas mãos que acarínham,
pelas mãos que elaboram a leis,
pelas mãos que cicatrizam feridas,
retificando as carnes sofridas,
balsamizando as dores de muitas vidas!*

*Pelas mãos que trabalham o solo,
que amparam o sofrimento e estancam lágrimas...
Pelas mãos que ajudam os que sofrem,
os que padecem...
Pelas mãos que brilham nesses traços,
como estrelas sublimes fulgindo em meus braços!*

DEUS, muito obrigada por tudo!

Obrigada...

*Pela minha voz...
E também,
pela voz que ama, canta, ajuda, socorre, ensina, ilumina...*

A minha orientadora,

Prof.^a Dr.^a Eliana Aparecida Varanda.

AGRADECIMENTOS

Aos pesquisadores Nicolás Olea, Mariana Fernández e José Manoel Molina, do Centro de Investigações Biomédicas da Universidade de Granada (Espanha), pela disposição dos conhecimentos e exemplar receptividade para a execução do trabalho de cultivo e ensaios e-screen.

As professoras Denise Crispim Tavares, Taís Maria Bauab e Lourdes C. dos Santos, por aceitarem participar da defesa e compor a banca para avaliação desse trabalho com total disponibilidade e dedicação. A professora Stella G. Raddi, por contribuir de maneira importante no exame geral de qualificação.

Ao professor Wagner Vilegas, por dispor cordialmente todo o seu valioso conhecimento em prol da realização desse trabalho.

A Prof^ª Dr^ª. Miriam Sannomiya e a Dr^ª. Tamara Regina Calvo, pela amizade e responsabilidade em fornecer os extratos vegetais e compostos avaliados.

Ao Dr. Clenilson Rodrigues, pelo apoio indispensável na execução e interpretação das técnicas analíticas. Obrigada por fortalecer os laços de cooperação e amizade sincera.

A Bete, do laboratório de Farmacologia dessa faculdade, que de maneira extremamente eficiente, me auxiliou em algumas etapas desse trabalho. A você, dedico meu trabalho, meu carinho e admiração!

A professora Raquel Regina Duarte Moreira e ao técnico Luis Eduardo dos Santos, do Laboratório de Farmacognosia, pela amizade e experiência docente que tivemos ao longo desse período.

A Edinéia, Marisa e Silvia, do laboratório de Microbiologia Básica, pela amizade e auxílio no desenvolvimento de metodologias e preparo de materiais. Seus conselhos e experiência são extremamente valiosos!

Aos meus companheiros do Laboratório de Mutagênese, em especial à Soraya e Fábio, que me ajudaram a iniciar essa jornada. Obrigada pela amizade e alegria do convívio.

A minha grande e eterna amiga, Mariana Carina Frigieri. Obrigada por seus valiosos e sábios conselhos. Sem eles, jamais teria iniciado minha carreira acadêmica.

Aos meus grandes amigos do Instituto de Química de Araraquara – UNESP, em especial ao Maicon Petrônio, pelas horas alegres e muitos planos (e sonhos!) científicos comuns.

A Cláudia, Sônia e Laura, da seção de Pós-Graduação, pelo apoio sempre carinhoso e inestimável orientação.

A todos os funcionários e professores da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara - UNESP, cujo trabalho conjunto proporciona a formação de uma instituição de qualidade ímpar.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara - UNESP, pela oportunidade de concretizar esse trabalho.

Ao Programa Biota - FAPESP, pela iniciativa e promoção de um trabalho integrado em prol da utilização sustentável da Biodiversidade.

A CAPES, pelo auxílio financeiro na execução desse trabalho, no Brasil e na Espanha.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, me auxiliaram na realização desse trabalho.

OBRIGADA!

*“Ervas e arbustos que enfeitam as árvores,
campos e margens dos caminhos são tesouros valiosos para a medicina,
que poucos olhos vêem e poucas mentes compreendem...
Por causa desse descaso, toda a humanidade sofre imensa perda”.*

Carl Von Linnéus (1707 - 1778).

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo estudar quatro espécies relacionadas no Projeto BIOTA-FAPESP, as quais têm se destacado quanto às atividades farmacológicas: *Byrsonima fagifolia* Niedenzu, *Byrsonima crassa* Niedenzu, *Indigofera truxillensis* Kunth e *Indigofera suffruticosa* Miller. Foram realizados ensaios de mutação gênica reversa utilizando-se as linhagens TA98, TA100, TA97a e TA102 de *Salmonella typhimurium*, com ausência e presença do sistema metabólico de ativação. Foram avaliados extratos, frações e algumas substâncias isoladas, a saber: a) *B. crassa*: amentoflavona, substância isolada do extrato metanólico; b) *B. fagifolia*: extrato metanólico e clorofórmico, frações acetato e aquosa, ácido gálico, galato de metila, ácido quínico e o ácido 3,4-digaloilquínico; c) *I. truxillensis* e *I. suffruticosa*: extrato metanólico e clorofórmico, frações de alcalóides, flavonóides e de glicerolipídeos, além das substâncias índigo, indirubina e o kaempferol-3,7-diraminosídeo. Foi também avaliada a isatina, molécula precursora dos alcalóides índigo e indirubina. As atividades anti-bacteriana, anti-*Leishmania*, citotóxica e fitoestrogênica foram avaliadas para substâncias isoladas. Os ensaios de atividade fitoestrogênica foram realizados através do método de *e-screen*, utilizando-se células tumorais MCF7. Os ensaios de atividade citotóxica (células MCF-7) foram realizados pela técnica de sulforadamina-B. Os ensaios anti-*Leishmania* (*L. amazonensis*) também foram realizados com as técnicas de MTT (sal de tetrazólio) e contagem manual em câmara de Neubauer. A atividade anti-bacteriana foi avaliada através das técnicas de difusão em agar e microdiluição, com as bactérias *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Escherichia coli* ATCC 25922. Estudos anteriores evidenciaram o potencial mutagênico do extrato metanólico de *B. crassa*, assim como a amentoflavona isolada do mesmo. Os resultados de mutagenicidade foram negativos para os extratos e frações de *B. fagifolia*, enquanto as substâncias isoladas (ácido gálico, galato de metila e ácido quínico) apresentaram indícios de mutagenicidade nas concentrações testadas em TA 98. Os resultados foram positivos para o extrato metanólico de *I. truxillensis* (linhagem TA98) e para os alcalóides índigo e indirubina isolados dessa espécie e de *I. suffruticosa*, além da isatina. Esse precursor também se destacou por seu potencial anti-bacteriano, citotóxico para células MCF7 e anti-*Leishmania*. A atividade estrogênica foi observada para a rutina e o kaempferol-3,7-diraminosídeo, presentes em *I. suffruticosa* e *I. truxillensis* respectivamente. Os demais ensaios (atividade antiestrogênica e inibição de aromatase) foram negativos. Destacamos que os resultados obtidos foram muito importantes no contexto do projeto temático BIOTA, uma vez que resultaram em novas informações farmacológicas das espécies avaliadas.

Palavras-chave: *Byrsonima*, *Indigofera*, *mutagenicidade*, *atividade estrogênica*, *atividade antimicrobiana*, *Leishmania*.

ABSTRACT

The present work aimed to investigate four related species in the project BIOTA-FAPESP which are notable for their pharmacological activities: *Byrsonima fagifolia* Niedenzu *Byrsonima crassa* Niedenzu, *Indigofera truxillensis* Kunth and *Indigofera Indigofera suffruticosa* Miller. Tests of reverse gene mutation were performed using TA98, TA100, TA97 and TA102 strains of *S. typhimurium* in the absence and presence of metabolic activation system. Extracts, fractions and some isolated compounds were evaluated: a) *B. fagifolia*: methanolic and chloroformic extracts, acetate and aqueous fractions, gallic acid, methyl gallate, quinic acid and 3,4-digalolilquinico derivative. b) *I. truxillensis* and *I. suffruticosa*: chloroformic and methanolic extracts, fractions of alkaloids, flavonoids and glicerolipides, and also the indigo, indirubin and kaempferol-3,7-diraminosídeo substances. The isatin, precursor molecule of alkaloids indigo and indirubin was also evaluated. The antimicrobial, antiparasitic, cytotoxic and phytoestrogenic activities were evaluated for natural isolated substances. The phytoestrogenic activity assays were performed using the e-screen method, using MCF7 tumor cells. Trials of cytotoxic activity (MCF-7 cells) were done using sulforadamina-B. The anti-*Leishmania* tests (*L. amazonensis*) were also performed with some alkaloids and flavonoids, using MTT techniques (tetrazolium salt) and manual counting in a Neubauer chamber. Antimicrobial activity was evaluated using disc diffusion techniques and microdilution with *S. aureus* ATCC 25923 and *E. coli* ATCC 25922 bacterias. The mutagenic activity assays showed positive results only for the methanol extract of *I. truxillensis* (strain TA98) and for the alkaloids indirubin and indigo isolated from this specie and *I. suffruticosa*, in addition to isatin. This precursor is also noted for its antimicrobial activity, cytotoxic to MCF7 cells and anti-parasitic effect. The estrogenic activity was observed in rutin and kaempferol-3,7-diraminosídeo present in *I. suffruticosa* and *I. truxillensis* respectively. We emphasize that the results were very important in the context of the thematic project BIOTA since it resulted in new information about pharmacological species evaluated.

Keywords: *Byrsonima*, *Indigofera*, *mutagenic activity*, *estrogenic activity*, *antimicrobial activity*, *Leishmania*.

LISTA DE ABREVIATURAS

17 β -E₂: 17-beta-estradiol
+S9: com ativação metabólica
-S9: sem ativação metabólica
AGM: agar mínimo glicosado
ANOVA: Análise de variância
ATCC: American Type Culture Collection
BUS: clone de células MCF7 que apresentam melhor resposta ao estrogênio
CCD: cromatografia em camada delgada
CBM: concentração bactericida mínima
CC: cromatografia em coluna
CCDC: cromatografia em camada delgada comparativa
CETESB: Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental
CHCl₃: clorofórmico
CIM: concentração inibitória mínima
COX-2: ciclooxigenase tipo 2
DCM: diclorometânico
DMEM: Dulbecco's modification of Eagle's medium
DMSO: dimetilsulfóxido
DNA: ácido desoxiribonucléico
DP: desvio padrão
EDTA: ácido etilendiamino tetra-acético
EM: espectrometria de massas
EP: efeito proliferativo
EPR: eficácia proliferativa relativa
FLA₂: fosfolípídeo A₂
GPC: cromatografia de permeação em gel
gCOSY: *gradient correlated spectroscopy*
gHMBC: *gradient heteronuclear multiple bond correlation*
gHMQC: *gradient heteronuclear through multiple quantum coherence*
HEPES: (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid)
HPLC: cromatografia líquida de alta eficiência
INCA: Instituto Nacional do Câncer (Brasil)
IV: infravermelho
IC50: Índice de citotoxicidade para 50% da população em estudo
MAO: linhagem tumoral humana de mama
MeOH: metanol/metanólico
MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-brometo de difeniltetrazólio
NADH: nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADPH: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida
NPD: 4-nitrofenilenodiamina
NP/PEG: difenilaminoborato/polietilenoglicol
PBS: solução salina tamponada com fosfato
PGE₂: prostaglandina E₂
PPR: eficácia proliferativa relativa
RE α +: célula com hiperexpressão de receptores estrogênicos alfa
RM: razão de mutagenicidade
RMN: ressonância magnética nuclear
RNA: ácido ribonucléico
UV: ultravioleta

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Mutagenicidade expressa pela média \pm desvio padrão do número de revertentes/placa em linhagens de *S.typhimurium* (TA98, TA97a, TA100 e TA 102) expostas aos extratos de *B. fagifolia* em várias concentrações, sem (-S9) e com (+S9) ativação metabólica.....65
- Tabela 2.** Mutagenicidade expressa pela média \pm desvio padrão do número de revertentes/placa em linhagens de *S. typhimurium* (TA98, TA97a, TA100 e TA 102) expostas às frações do extrato metanólico de *B. fagifolia* em várias concentrações, sem (-S9) e com (+S9) ativação metabólica.....66
- Tabela 3.** Atividade mutagênica expressa pela média \pm desvio padrão do número de revertentes por placa (linhagem TA98) exposta às substâncias isoladas do extrato metanólico de *B. fagifolia* em várias concentrações, sem (-S9) e com (+S9) ativação metabólica.....68
- Tabela 4.** Mutagenicidade expressa pela média \pm desvio padrão do número de revertentes/placa em linhagens de *S. typhimurium* (TA98, TA97a, TA100 e TA 102) expostas aos extratos de *I. truxillensis* em várias concentrações, sem (-S9) e com (+S9) ativação metabólica.....75
- Tabela 5.** Mutagenicidade expressa pela média \pm desvio padrão do número de revertentes/placa em linhagens de *S. typhimurium* (TA98, TA97a, TA100 e TA 102) expostas às frações do extrato metanólico de *I. truxillensis* em várias concentrações, sem (-S9) e com (+S9) ativação metabólica.....76
- Tabela 6.** Mutagenicidade expressa pela média \pm desvio padrão do número de revertentes/placa com a linhagem TA98 exposta a diferentes concentrações de kaempferol-3,7-dira, sem (-S9) e com (+S9) ativação metabólica.....77
- Tabela 7.** Atividade mutagênica expressa pela média \pm desvio padrão do número de revertentes por placa (linhagem TA98) exposta às substâncias isoladas do extrato metanólico de *I. truxillensis* em várias concentrações, sem (-S9) e com (+S9) ativação metabólica.....79
- Tabela 8.** Atividade mutagênica expressa pela média \pm desvio padrão do número de revertentes/placa em linhagens de *S. typhimurium* (TA98, TA97a, TA100 e TA 102) expostas aos extratos de *I. suffruticosa* em várias concentrações, sem (-S9) e com (+S9) ativação metabólica.....86
- Tabela 9.** Mutagenicidade expressa pela média \pm desvio padrão do número de revertentes/placa em linhagens de *S. typhimurium* (TA98, TA97a, TA100 e TA 102) expostas às frações do extrato metanólico de *I. suffruticosa* em várias concentrações, sem (-S9) e com (+S9) ativação metabólica.....87

Tabela 10. Efeito proliferativo das principais concentrações da curva de estradiol (e-screen).....	91
Tabela 11. Proliferação celular da amentoflavona (e-screen).....	93
Tabela 12. Proliferação celular do ácido gálico (e-screen).....	94
Tabela 13. Proliferação celular do kaempferol-3,7-dira (e-screen).....	95
Tabela 14. Proliferação celular da rutina (e-screen).....	96
Tabela 15. Resumo da análise estatística dos parâmetros de atividade estrogênica (e-screen).....	98
Tabela 16. Estrogenicidade da rutina com antagonista (ICI).....	99
Tabela 17. Estrogenicidade do kaempferol-3,7-dira com antagonista (ICI).....	100
Tabela 18. Atividade anti-estrogênica na presença de estradiol – amentoflavona.....	102
Tabela 19. Atividade anti-estrogênica na presença de estradiol – ácido gálico.....	102
Tabela 20. Atividade anti-estrogênica na presença de estradiol – rutina.....	102
Tabela 21. Atividade anti-estrogênica na presença de estradiol – kaempferol-3,7-dira.....	103
Tabela 22. Inibição de aromatase na presença de testosterona – amentoflavona.....	103
Tabela 23. Inibição de aromatase na presença de testosterona – ácido gálico.....	103
Tabela 24. Inibição de aromatase na presença de testosterona – rutina.....	104
Tabela 25. Inibição de aromatase na presença de testosterona – kaempferol-3,7-dira.....	104
Tabela 26. Resumo dos resultados de atividade anti-estrogênica e inibição de aromatase obtidos com o método e-screen.....	104
Tabela 27. Índice citotóxico (IC50) das moléculas isoladas das espécies de <i>Byrsonima</i> e <i>Indigofera</i> pela técnica de sulforodamina-B.....	123
Tabela 28. Índices tóxicos (IC50) da isatina e do ácido gálico pela técnica de MTT.....	128
Tabela 29. Análise estatística da contagem manual para avaliação da atividade anti- <i>Leishmania</i> da isatina e do ácido gálico.....	128
Tabela 30. Halos de inibição obtidos nos ensaios de difusão em disco com as substâncias isoladas das espécies vegetais para <i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i>	129
Tabela 31. Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) das substâncias isoladas das espécies vegetais ($\mu\text{g/mL}$) para <i>S. aureus</i> e <i>E. coli</i> – método de microdiluição.....	130

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismo de ação do estrogênio via receptor (adaptado de Alves & Silva, 2002).....	29
Figura 2. Processos gerais para a obtenção dos extratos vegetais.....	37
Figura 3. Isolamento da amentoflavona.....	38
Figura 4. Estruturas das substâncias isoladas de <i>B. fagifolia</i>	39
Figura 5. Esquema geral: processamento do extrato metanólico de <i>I. truxillensis</i>	40
Figura 6. Estruturas químicas da indirubina (A) e do índigo (B).....	41
Figura 7. Estrutura do kaempferol-3,7-diraminosídeo.....	41
Figura 8. Esquema geral: processamento do extrato metanólico de <i>I. suffruticosa</i>	42
Figura 9. Estruturas das substâncias avaliadas nos ensaios biológicos.....	43
Figura 10. Teste de Ames, sem e com ativação metabólica.....	46
Figura 11. Etapas do ensaio de proliferação celular (<i>e - screen</i>).....	52
Figura 12. Principais concentrações da curva de estradiol.....	91
Figura 13. Proliferação celular com amentoflavona.....	93
Figura 14. Proliferação celular com ácido gálico.....	94
Figura 15. Proliferação celular com kaempferol-3,7-dira.....	95
Figura 16. Ensaio de proliferação celular com rutina.....	96
Figura 17. Proliferação celular com rutina na presença de ICI.....	99
Figura 18. Proliferação celular com kaempferol-3,7-dira na presença de ICI.....	100
Figura 19. Viabilidade celular na presença de solventes.....	106
Figura 20. Viabilidade celular na presença de indirubina.....	107
Figura 21. Viabilidade celular na presença de índigo.....	110
Figura 22. Viabilidade celular na presença de isatina.....	112
Figura 23. Viabilidade celular na presença de ácido gálico.....	115
Figura 24. Viabilidade celular na presença de ácido quínico.....	116
Figura 25. Viabilidade celular na presença de amentoflavona.....	118

Figura 26. Viabilidade celular na presença de rutina.....	120
Figura 27. Viabilidade celular na presença de kaempferol-3,7-dira.....	121
Figura 28. Viabilidade de <i>L. amazonensis</i> na presença de isatina.....	126
Figura 29. Viabilidade de <i>Leishmania amazonensis</i> na presença de ácido gálico.....	127
Figura 30. Crescimento de <i>E. coli</i> (EC) e <i>S. aureus</i> (SA) na presença de isatina.....	131
Figura 31. Crescimento de <i>E. coli</i> (EC) e <i>S. aureus</i> (SA) na presença de indirubina.....	131
Figura 32. Crescimento de <i>E. coli</i> (EC) e <i>S. aureus</i> (SA) na presença índigo.....	132
Figura 33. Crescimento de <i>E. coli</i> (EC) e <i>S. aureus</i> (SA) na presença rutina.....	133
Figura 34. Crescimento de <i>E. coli</i> (EC) e <i>S. aureus</i> (SA) na presença de amentoflavona.....	134
Figura 35. Crescimento de <i>E. coli</i> (EC) e <i>S. aureus</i> (SA) na presença de ácido gálico.....	134
Figura 36. Crescimento de <i>E. coli</i> (EC) e <i>S. aureus</i> (SA) na presença de ácido quínico.....	135
Figura 37. Crescimento de <i>E. coli</i> (EC) e <i>S. aureus</i> (SA) na presença de kaempferol-3,7-dira.....	135

SUMÁRIO

CAPÍTULO I.....	14
1. INTRODUÇÃO.....	14
1.1. Da planta ao medicamento: a história da fitoterapia no mundo.....	14
1.2. A história da fitoterapia no Brasil.....	17
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	20
2.1. Biodiversidade.....	20
2.2. Potencial terapêutico da flora brasileira e do cerrado.....	20
2.3. Pesquisa de novos fármacos de origem vegetal.....	21
2.4. Espécies do cerrado brasileiro: Gênero <i>Byrsonima</i>	22
2.5. Espécies do cerrado brasileiro: Gênero <i>Indigofera</i>	24
2.6. Mutagenicidade.....	25
2.7. Atividade fitoestrogênica.....	26
2.8. Atividade citotóxica em células tumorais humanas (MCF7).....	30
2.9. Atividade anti- <i>Leishmania</i>	31
2.10. Atividade anti-bacteriana.....	32
3. OBJETIVOS.....	34
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	36
4.1. Droga vegetal.....	36
4.2. Extratos, frações e substâncias isoladas.....	36
4.3. Ensaio de mutagenicidade: Teste de Ames (Maron & Ames, 1983).....	43
4.4. Ensaio de atividade fitoestrogênica: <i>e-screen</i> (Villalobos et al., 1995).....	46
4.5. Ensaio de citotoxicidade (Skehan et al., 1990).....	52
4.6. Ensaio de atividade anti- <i>Leishmania</i> (Muelas-Serrano et al., 2000).....	54
4.7. Ensaio de atividade antimicrobiana (NCCLS, 2003 a,b).....	55
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	59
5.1. Avaliação da atividade mutagênica.....	62
5.2. Avaliação da atividade fitoestrogênica.....	88
5.3. Avaliação da atividade citotóxica.....	105
5.4. Avaliação da atividade anti- <i>Leishmania</i>	124
5.5. Avaliação da atividade antimicrobiana.....	129
6. CONCLUSÕES.....	137
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	139

ARTIGOS

ANEXOS

CAPÍTULO I

1.1. Da planta ao medicamento: a história da fitoterapia no mundo

“O início de um hábito é como um fio invisível, mas a cada vez que o repetimos, o ato reforça o fio, acrescentando-lhe outro filamento, até que se torna um grande cabo e nos prende de forma irremediável, no pensamento e ação”.

(Orison Swett Marden)

O emprego dos vegetais perde-se na história dos seres humanos. Na pré-história, ao observarem o hábito dos animais, os humanos provavelmente começaram a manipular e usar plantas para aliviarem os sintomas de moléstias e ferimentos (SIMÕES et al., 1999; MARQUES, 1999). O consumo de plantas medicinais teria sido a primeira forma de uso de remédios que se tem notícia (BRAGANÇA, 1996). A busca e a utilização de plantas com propriedades medicinais é uma prática milenar, atestada em vários tratados de fitoterapia das grandes civilizações há muito tempo desaparecidas. Desde 3000 a.C., os chineses e os egípcios já cultivavam plantas medicinais (SILVA JUNIOR, 2003). O papiro de Ebers (descoberto em 1873, pelo egiptólogo alemão Ebers) é um dos primeiros documentos escritos sobre fitoterapia (FORÈS, 2004). Além de seu valor histórico, representa um conjunto de informações, prescrições e fórmulas (TIERRAS, 2008).

Na literatura médica indiana constam informações sobre o emprego muito amplo de plantas medicinais (NATURAL HEALTH SCHOOL, 2008). O texto mais antigo da Medicina Tradicional Chinesa data de aproximadamente 800 a.C., relatando fórmulas e empregando ervas para o tratamento de diversas doenças (BOTSARIS, 2004).

Um dos mais importantes representantes da história da medicina foi Hipócrates (468-377 a.C.), que concebeu formas de tratamento à base de plantas medicinais (ELDIN SUE et al., 2001). No ano de 46 a.C., houve um marco da história da medicina tradicional romana,

sob o governo de Júlio César, com o maior conhecimento sobre fitoterapia como complemento aos costumes da época (TIERRAS, 2008).

Desde a antiguidade, o conhecimento do uso de plantas medicinais foi passado a cada geração. Não foi, portanto, uma prática individual, mas do contexto de toda a humanidade (FÒRES, 2004). Na Idade Média, a medicina e a utilização de plantas medicinais estagnaram por um longo período. Muitos manuscritos gregos foram esquecidos ou perdidos, sendo alguns deles recuperados apenas no início do século XVI (MARTINS et al., 1994). Nos mosteiros, a arte de curar com plantas foi mantida graças ao trabalho de monges, que traduziram os primeiros trabalhos sobre o tema e mantinham plantações de ervas medicinais (ASOCIACIÓN ARGENTINA DE FITOTERAPIA, 2007).

A civilização árabe trouxe importantes contribuições à medicina natural e a ela se deve o emprego dos purgativos vegetais. No século X, se impõe o nome do médico islâmico Avicena, estudioso botânico, criador de um tratado sobre medicamentos cardíacos. Sua obra mais importante, "Canon", foi durante muito tempo o texto médico mais popular da Europa (BOLZANI et al., 2002).

Durante a conquista da América, os padres trouxeram os seus conhecimentos, aos quais foram enriquecidos pelo contato com os indígenas (ASOCIACIÓN ARGENTINA DE FITOTERAPIA, 2007). As culturas americanas, especialmente a Inca, Asteca, Maya, Olmeca e Tolteca consignaram à civilização moderna a quina, a ipecacuanha, a coca e muitas outras drogas de valor terapêutico (BOLZANI et al., 2002). Os índios da América Central e do Sul possuíam um grande conhecimento sobre ervas nativas. Hoje, muitas plantas utilizadas na terapêutica são resultantes de suas culturas e tradições (NATURAL HEALTH SCHOOL, 2008).

Por volta do ano 1800, com o advento da chamada "medicina científica", a fitoterapia foi relegada ao plano de uma modalidade alternativa de tratamento (SCHULZ et al., 2002). Durante os séculos XVII e XVIII, a fitoterapia parecia estar em decadência, pois se

prosseguiam as experiências com a “era sintética”, que incluía substâncias perigosas, como o arsênio e o mercúrio. Na década de 1890, a “medicina botânica” passou por uma revitalização e as pessoas utilizavam, em seu dia-a-dia, os remédios à base de plantas medicinais (ELDIN SUE et al., 2001).

O isolamento das primeiras substâncias puras do reino vegetal começou a acontecer no século XVIII. Este século, juntamente com o XIX, se caracteriza pelos trabalhos de pesquisa e extração, principalmente de ácidos orgânicos e de alcalóides. A partir da década de trinta, começaram a surgir um grande número de trabalhos sobre o isolamento e a identificação de substâncias de natureza esteroidal e, mais tarde, sobre a síntese de importantes substâncias de origem vegetal, como os alcalóides quinina (1945), a estriquinina (1954) e a reserpina, em 1958 (BOLZANI et al., 2002).

Houve o ressurgimento do interesse pela fitoterapia (não somente científico e restrito, mas também clínico) somente na Primeira Guerra Mundial, quando os suprimentos de medicamentos se reduziram e foram substituídos obrigatoriamente por plantas medicinais (STEDMAN, 2002).

Após a Segunda Guerra Mundial, a fitoterapia foi fortalecida na Inglaterra. Apesar de muitas dificuldades quanto à legalização da prescrição de plantas medicinais, foi elaborado o Decreto sobre Medicamentos em 1968, ampliando a aplicação de plantas na terapêutica e desenvolvendo a fitoterapia a partir de então (ELDIN SUE et al., 2001).

Muito difundida e desenvolvida na China, a fitoterapia começou a se expandir para vários países ocidentais há cerca de duas décadas, devido aos excelentes resultados clínicos (BOTSARIS, 2004). A China foi o primeiro país a incorporar a fitomedicina à medicina ocidental clássica (LEVETIN & MAHON, 2007).

A partir do começo do século XIX, os produtos de origem vegetal se tornaram objetos de pesquisa científica. Com o desenvolvimento de métodos de análise química, os cientistas iniciaram a extração, isolamento e transformação de princípios ativos de plantas medicinais

em produtos sintéticos (SCHULZ et al., 2002; HART, 2007; DOS SANTOS, 2006). A Alemanha é a nação que mais incentivou a fitoterapia. Nesse país, cerca de 700 produtos fitoterápicos são comercializados e 70% dos profissionais da área de saúde alemães prescrevem esses produtos, mantendo um dos maiores mercados mundiais nessa área. Nos Estados Unidos, a indústria tem mais de 500 espécies de plantas medicinais comercializadas. O *marketing* de massa divulga lojas de produtos naturais, levando a um rápido crescimento nas vendas de produtos a base de plantas (FETROW et al., 1999).

Atualmente, a Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que 80% da população mundial acreditam que a utilização de plantas medicinais possa curar algum tipo de doença (HART, 2007). A OMS definiu como Fitoterapia a aplicação de princípios ativos de origem vegetal na terapia clínica. Os métodos modernos de extração, identificação e padronização de drogas vegetais, em conjunto com a pesquisa científica (testes *in vitro*, *in vivo*, ensaios pré-clínicos e clínicos), permitiram maior confiabilidade e conhecimento da eficácia e segurança dos fitoterápicos (ASOCIACIÓN ARGENTINA DE FITOTERAPIA, 2007).

1.2. A história da fitoterapia no Brasil

No Brasil, a utilização de plantas medicinais teve influências das culturas indígena, africana e européia (MARTINS et al., 1994). O conhecimento indígena foi importante para ampliar o uso de plantas medicinais pelos colonizadores (OLIVEIRA, 2008). Os índios faziam com que o conhecimento das plantas nativas e seus usos fossem transmitidos de geração em geração (MARTINS et al., 1994; LORENZI, 2002).

A contribuição européia na fitoterapia brasileira teve início com a vinda dos primeiros jesuítas, ao redor de 1580, quando as plantas desempenhavam importante papel na preparação dos remédios (ALBUQUERQUE, 2006). Os jesuítas aproveitaram os conhecimentos indígenas sobre as plantas e as incluíram na manipulação dos fitoterápicos (LUCAS, 1941). A influência africana não é muito conhecida, porém foi muito importante. Os

escravos africanos contribuíram com a utilização de plantas medicinais trazidas da África (LORENZI et al., 2002).

Os primeiros médicos portugueses que vieram para o Brasil, diante da escassez de remédios, muito cedo foram obrigados a perceber a importância das preparações indígenas. Os viajantes sempre se abasteciam destes remédios antes de excursionarem por regiões pouco conhecidas (VEIGA JÚNIOR & PINTO, 2002). A vinda da Corte Real para o Brasil, em 1808, foi um dos marcos históricos oficiais da ciência brasileira, pois começaram a chegar ao país as primeiras expedições científicas, cujo principal objetivo era dar conhecimento aos europeus da exuberância de nossa fauna e de nossa flora (FREEDBERG, 1999). Por longo período, o estudo químico de produtos naturais, realizado em escala artesanal, esteve voltado para a comercialização de remédios e se desenvolvia nos laboratórios das antigas boticas (CARRARA & MEIRELLES, 1996).

Apesar de alguns trabalhos de pesquisa desenvolvidos até o momento, devido ao contexto científico, econômico e social do Brasil ao longo de sua história, a fitoterapia evoluiu muito lentamente, sob fortes influências externas (FERRO, 2006). No Brasil, muitas plantas foram e ainda são utilizadas como extratos, emplastos e infusões, sem evidências científicas que comprovem a eficácia desses tratamentos (HOLETZ et al., 2002). Embora seja o quinto maior consumidor mundial de remédios, possua grande riqueza natural e amplo patrimônio étnico-cultural, o mercado farmacêutico brasileiro é dominado por multinacionais (LOPES, 2004).

Contudo, atualmente, estamos vendo florescer novamente a fitoterapia brasileira, embora esse processo seja lento e difícil. Essa revolução começou com a publicação da Portaria 06/95 da Vigilância Sanitária, reforçando rigorosamente a necessidade do embasamento científico e comprovação de eficácia e segurança dos fitoterápicos. Foi substituída pela RDC 17/2000, com novas opções para o registro de medicamentos, mas sob o mesmo enfoque científico inicial. Em 2004, foram publicadas as RDC 48/2004, RE's

88/2004, 89/2004, 90/2004 e 91/2004, modernizando a regulamentação de fitoterápicos e concentrando as exigências quanto à qualidade e segurança desses medicamentos (BRANDÃO, 2005; CARLINI, 2008). A crescente exigência em relação aos parâmetros fundamentais de produção (eficácia, segurança e qualidade), tem contribuído para a integração de diversas áreas científicas na pesquisa de novas espécies vegetais e produtos, como: botânica, agronomia, fitoquímica, farmacologia, toxicologia, tecnologia farmacêutica, entre outras (BOLZANI et al., 2002). Sem dúvida, com a regulamentação da área e, recentemente, com a política de implantação de fitoterápicos na rede pública (SUS), a fitoterapia no Brasil tem atingido um aspecto mais amplo, com o ideal voltado também para atender uma maior parcela da população do país. A Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos objetiva a utilização racional de plantas medicinais e fitoterápicos, priorizando a preservação da biodiversidade, o desenvolvimento sustentável, além de um retorno desse benefício à população brasileira (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

2.1. Biodiversidade

“Quando entendemos que somos parte e não proprietários da natureza, iniciamos a caminhada rumo a um mundo mais justo e sustentável”.

(Adalgiza Inês Campolim)

A diversidade biológica possui inestimável valor para a sobrevivência do ser humano, proporcionando a manutenção do equilíbrio dinâmico dos ecossistemas. O Brasil também possui uma megadiversidade cultural, com populações indígenas detentoras de considerável conhecimento das espécies de flora e fauna, além de sistemas tradicionais de manejo dos recursos naturais renováveis. A contribuição desses povos é fundamental para a preservação do patrimônio biológico e genético de nosso país (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2002). A cultura popular, transmitida através de gerações e hoje muito estudada pela Etnobotânica, na verdade, representa um recurso terapêutico valioso, já que grande parte da população vive sem cuidados médicos científicos e condições sanitárias adequadas (FERRO, 2006). Esse conhecimento popular também está, juntamente com os recursos naturais, ameaçado de extinção, segundo publicação de Ana Rita Araújo, na edição nº 1567 do Boletim da UFMG, de março de 2007.

2.2. Potencial terapêutico da flora brasileira e do cerrado

A natureza, de forma geral, tem produzido a maioria das substâncias orgânicas conhecidas. Dentre os diversos reinos da natureza, o vegetal é o que tem contribuído de forma mais significativa para o fornecimento de metabólitos secundários, muitos destes de grande valor agregado devido às suas aplicações como medicamento, cosméticos,

alimentos e agroquímicos (SCHULZ et al., 2002). Muitas dessas substâncias constituem, sobretudo, em modelos para o desenvolvimento de medicamentos (RATES, 2001).

O cerrado é o segundo maior bioma brasileiro (depois da Amazônia) e concentra nada menos que um terço da biodiversidade nacional e 5% da flora e da fauna mundiais. Apesar das restrições edáficas e hídricas, graças aos estudos para manejo de solos, o cerrado tem se destacado como uma das maiores fronteiras agrícolas do mundo. Infelizmente, a ocupação econômica do cerrado tem ocorrido sem um adequado planejamento, sendo visto apenas como “chão a ser ocupado pelas atividades agrícolas” (MARRIS, 2005). Caso essa situação não se reverta, em alguns anos o cerrado será transformado em grandes pastos e terá perdido, permanentemente, toda a riqueza de espécies (COUTINHO, 2002).

O bioma cerrado é aquele que merece prioridade de conservação, tendo em vista o potencial de utilização que ainda oferece, principalmente quanto à riqueza de espécies de sua flora (MACHADO et al., 2004). Para que sejam garantidos o uso racional e sustentável e a preservação dos recursos naturais renováveis do cerrado, precisamos consolidar e divulgar os conhecimentos sobre sua estrutura, viabilizando a exploração sustentada de seus recursos (PEREIRA-SILVA et al., 2004).

2.3. Pesquisa de novos fármacos de origem vegetal

Existem no Brasil alguns grupos de pesquisa que têm contribuído significativamente para a área da química de produtos naturais, a taxonomia, a farmacologia e outras áreas relacionadas (YUNES et al., 2001). A Etnofarmacologia também faz parte da investigação de fitoterápicos e fitofármacos, combinando informações adquiridas junto às comunidades locais com estudos químico-farmacológicos realizados em laboratórios especializados (FERRO, 2006).

O estudo fitoquímico associado à farmacologia é de grande importância para a seleção de um dos compostos ativos ou da mistura de substâncias presentes no extrato que, em muitos casos, pode ser efetiva. Sob esse aspecto, é importante considerar que, em muitos extrativos vegetais, a associação de diferentes substâncias, as quais possuem diferentes mecanismos de ação terapêutica favorecerá, no futuro, o desenvolvimento de fitoterápicos mais eficazes e com menos efeitos adversos (BORRIS, 1997).

É importante lembrar os riscos intrínsecos relacionados com o consumo desordenado de produtos derivados de plantas e/ou plantas consideradas medicinais. Muitas plantas utilizadas por essas culturas antigas também tiveram atividades tóxicas descritas (SANTOS, 2006). Plantas utilizadas na dieta ou em tratamentos tradicionais têm mostrado atividade mutagênica (AMES, 1983; LIGHT et al., 2005), hepatotóxica (MACIEL et al., 1998), entre outras. Existe uma infinidade de casos descritos de toxicidade de produtos naturais. E esses riscos são ainda maiores quando o uso de tratamentos alternativos está associado à falta de estudos que comprovem a eficácia e a segurança dessas preparações (SANTOS, 2006).

2.4. Espécies do cerrado brasileiro: Gênero *Byrsonima*

O gênero *Byrsonima* pertence à família Malpighiaceae e suas espécies estão distribuídas por toda a região tropical da América. Essa família possui cerca de 800 espécies diferentes, das quais 50% se encontram no Brasil (SANNOMIYA et al., 2007a). As folhas e cascas de algumas espécies de *Byrsonima* são usadas popularmente em disfunções gástricas, picadas de cobra e ainda como anti-diarréicos (SANNOMIYA et al., 2005 a). Outras aplicações são relatadas quanto ao infuso das folhas para o tratamento de asma e infecções cutâneas (SILVA et al., 2001; AGUIAR et al., 2005). Vários estudos fitoquímicos com essas espécies revelaram, em geral, a presença de esteróides, triterpenos, flavonóides, proantocianidinas, ácidos galoilquínicos, entre outras substâncias (MENDES et al., 1999; SANNOMIYA et al., 2004; SANNOMIYA et al. 2005 a,b).

Byrsonima crassa Niedenzu (B. crassa): Essa espécie é conhecida popularmente como “murici vermelho” ou “murici do cerrado”. Suas folhas e cascas são utilizadas na medicina popular para o tratamento de infecções cutâneas, picadas de cobra, disfunções gástricas e diarreias. O estudo fitoquímico dos extratos da espécie resultou no isolamento da mistura de ácido gálico e galato de metila, quercetina-3-O- α -L-piranosídeo e a mistura de quercetina-3-O- β -D-glucopiranosídeo e quercetina-3-O- β -D-galactopiranosídeo. A avaliação do perfil cromatográfico de frações dos extratos revelou a presença de catequinas e flavonóides. Da infusão de folhas de *B. crassa*, foram isolados compostos extremamente polares, como derivados fenólicos, que possuem diversas atividades biológicas, como imunomodulação, proteção contra o câncer e doenças cardiovasculares. Além desses, foram isolados também catequinas e flavonóides, que possuem atividade antioxidante (SANNOMIYA et al., 2004, 2005 a,b). Os estudos da atividade mutagênica mostraram resultados positivos para o extrato metanólico e a fração acetato de etila em ensaios com *Salmonella*, mas negativos em animais. Dentre as substâncias isoladas que foram avaliadas destacamos o biflavonóide amentoflavona, que foi caracterizado como o principal responsável pela mutagenicidade observada no extrato metanólico da espécie (CARDOSO, 2006).

Byrsonima fagifolia Niedenzu (B. fagifolia): *B. fagifolia*, assim como outras espécies do gênero, é comum no cerrado e suas folhas são utilizadas, popularmente, para disfunções gástricas e diarreias (SANNOMIYA et al., 2005a). Estudos fitoquímicos demonstraram, na infusão das folhas e no extrato metanólico, a presença de derivados do ácido galoilquínico, além de derivados glicosilados da quercetina (SANNOMIYA et al., 2007 b). Poucos estudos quanto à atividade biológica dessa espécie já foram publicados, sendo apenas alguns relatos da atividade antioxidante do extrato metanólico e suas frações (PIMENTEL, 2004). Quanto aos derivados galoilquínicos, existem alguns relatos

interessantes sobre suas atividades biológicas, como anti-HIV (NISHIZAWA et al., 1989; CHANG et al., 1995), anti-malária (CAO et al., 2006) e anti-tumoral (NONAKA et al., 1992).

2.5. Espécies do cerrado brasileiro: Gênero *Indigofera*

O gênero *Indigofera* (Fabaceae) compreende 700 espécies herbáceas e arbustivas, que ocorrem nas regiões tropicais e subtropicais (DI STASI & HIRUMA-LIMA, 2002), encontradas nas Américas, África, Austrália e Ásia (MOREIRA & AZEVEDO-TOZZI, 1997). Flavonóides, alcalóides, terpenos e saponinas são os metabólitos secundários majoritários em espécies de Fabaceae (HARBONE & WILLIAMS, 2000), os quais possuem interessantes atividades farmacológicas e terapêuticas. Dessas plantas é obtido o índigo, um dos corantes naturais mais antigos que se conhece (AL MESHAL et al., 1982). Também se tem observado as atividades antioxidante, hepatoprotetora (SREEPRIYA et al., 2001) e, em Cuba, estudos relatam importante ação antiúlcera gástrica (GOVIN et al., 2006).

***Indigofera truxillensis* Kunth (*I. truxillensis*):** Existem poucos relatos na literatura sobre estudos científicos relacionados às atividades biológicas e ao perfil químico dessa espécie. Estudos farmacológicos realizados com extratos e frações de *I. truxillensis* demonstraram seu potencial antioxidante e antiulcerogênico em diferentes modelos de úlcera gástrica aguda (por etanol, piroxicam, stress por retenção/frio e ligadura de piloro) em ratos, sem sinais de toxicidade aguda (COLA-MIRANDA et al., 2006; BARBASTEFANO et al., 2006). Estudos fitoquímicos realizados com a espécie identificaram a presença de flavonóides derivados do kaempferol e alcalóides (CALVO, 2007).

***Indigofera suffruticosa* Miller (*I. suffruticosa*):** *I. suffruticosa* é uma espécie vegetal encontrada em regiões tropicais e subtropicais, adaptada aos solos semi-áridos e de baixa fertilidade (PAIVA et al. 1987). A utilização popular dessa espécie como remédio baseia-se no preparo da infusão ou decocção das folhas (MATOS, 1999). As indicações populares são diversas, destacando-se os tratamentos contra infecções bacterianas e fúngicas (LEITE et al., 2006), inflamações (LEITE et al., 2003) e outras doenças, como epilepsia em humanos

(ROIG, 1974) e modelos animais (WONG et al., 1999). Outros estudos demonstraram o potencial embriotóxico *in vitro* dos extratos de *I. suffruticosa* (LEITE et al., 2004). Estudos fitoquímicos demonstraram a presença de flavonóides derivados da quercetina (entre eles, a rutina), ácido gálico e alcalóides (CALVO, 2007).

2.6. Mutagenicidade

Mutações são definidas como qualquer alteração permanente no DNA e podem acontecer em células germinativas ou somáticas, envolvendo mutações cromossômicas e mutações gênicas. Existem muitos fatores que podem ocasionar a mutação da molécula de DNA, os quais são chamados de agentes mutagênicos. 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). Estamos constantemente em contato com agentes mutagênicos, entre eles a radiação solar, poluentes presentes no ar e na água ou mesmo elementos presentes em nossa dieta (SANTOS, 2006).

A avaliação da mutagenicidade pode ser realizada nos diferentes passos de interação do agente mutagênico com o DNA ou de seus efeitos (SANTOS, 2006). Vários ensaios que detectam componentes genotóxicos permitem identificar substâncias com risco potencial à saúde humana. O teste de mutagenicidade com *Salmonella typhimurium*, também conhecido como *Salmonella*/microsomo, ou Teste de Ames, é uma das metodologias mais utilizadas atualmente para detectar substâncias mutagênicas (VARELLA et al., 2004), sendo validado em larga escala por diversos laboratórios (MORTELMANS & ZEIGER, 2000; RIBEIRO et al., 2004). Nesse ensaio, são utilizadas linhagens de *S. typhimurium* que, na presença do agente mutagênico, reverterem seu caráter auxotrófico para a síntese de histidina, crescendo em meios que não possuem este aminoácido. O crescimento das colônias revela uma mutação reversa induzida pelo agente e a contagem das mesmas caracteriza a ação

mutagênica em função da concentração utilizada (ZEIGER, 2001). Foram estabelecidas relações entre a atividade mutagênica de agentes químicos ou físicos e a capacidade dos mesmos de induzir o câncer em ensaios com animais (MARON & AMES, 1983). Cada tipo de linhagem bacteriana apresenta diferentes mutações no *operon* histidina, o que permite diferenciar mecanismos de ação. As mutações podem ser substituições de bases ou do tipo *frameshift* (AMES, 1983; MORTELMANS & 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 de metabolização de xenobióticos e é obtida a partir do fígado de ratos. Todas essas características conferem ao Teste de Ames uma grande capacidade de identificação e caracterização de diferentes agentes mutagênicos, com grande eficiência e sensibilidade (SANTOS, 2006).

2.7. Atividade Fitoestrogênica

Os fitoestrogênios são compostos fenólicos heterocíclicos com similaridades estruturais e funcionais com os estrogênios naturais e sintéticos, as quais lhes conferem a capacidade de adesão ao receptor hormonal, agindo como agonistas ou antagonistas do estrogênio, dependendo do lugar de atuação (ARIË et al., 2001; FONSECA et al., 2005). Esses compostos são encontrados em diversas fontes de alimentos (CHIECHI et al., 1999).

As substâncias precursoras, depois de ingeridas, sofrem conversões enzimáticas complexas no tubo digestivo (ROSA LIMA, 2006). Pelas características metabólicas, os fitoestrogênios podem ser mensurados em vários fluidos biológicos e as concentrações dos seus metabólitos apresentam uma variação entre os indivíduos, mesmo quando em quantidade controlada (MURKIES et al., 1998). Existem diferenças biológicas entre os mecanismos de ação dos fitoestrogênios, dos estrógenos naturais e dos sintéticos. Os

estrógenos naturais são potentes, facilmente metabolizados pelo fígado, têm meia-vida curta e não se acumulam nos tecidos. Os fitoestrogênios são pouco potentes, têm meia-vida mais longa e tendem a se acumular na gordura e nos tecidos (MOSQUETTE et al., 2005).

Os receptores estrogênicos possuem estrutura semelhante à de outros hormônios esteróides. O receptor estrogênico alfa (RE alfa) é uma proteína composta por 595 aminoácidos (KOIKE & SAKAI, 1987) e o receptor estrogênico beta (RE beta) foi definido como uma proteína de 485 aminoácidos, com localização e características de ação diferentes (MOSELNANN et al., 1996). Os receptores estrogênicos estão distribuídos por diversos órgãos em frequências diferentes, com predominância de um tipo sobre o outro. Os recentes estudos em biologia molecular permitiram conhecer melhor os mecanismos envolvidos na ação dos esteróides em seus receptores (BAKER & JAFFER, 1995).

Segundo os estudos de Mosselmann e cols. (1996), são vários os fatores que determinam a ação biológica de um estrogênio, como a afinidade do hormônio pelo receptor, diferenças na expressão dos receptores nos tecidos-alvo, alterações da conformação do complexo hormônio-receptor e diferenças de expressão de proteínas de adaptação e fosforilação (figura 1). A atividade biológica de um estrógeno se dá pela ocupação do complexo hormônio-receptor no núcleo celular. A variação da potência de ação está relacionada aos níveis plasmáticos e à retenção do complexo no núcleo, diferenciando os estrógenos mais fracos dos mais potentes, assim como os mecanismos de ação estrogênica e anti-estrogênica (SPEROFF & FRITZ, 2005). É importante ressaltar que, além da ação hormonal, os fitoestrogênios também possuem efeitos relacionados à atividade enzimática. Estudos *in vitro* demonstram a inibição do crescimento e regulação de células, mesmo na ausência de receptores estrogênicos. São várias enzimas que sofrem essa influência, como tirosinoquinase, DNA topoisomerasas I e II, quinase ribossomal S6, além da aromatase. A aromatase é uma enzima implicada na formação do 17- β -estradiol a partir de seus precursores (MOL & MONTALBÁN, 2001).

Os fitoestrogênios também possuem a capacidade de adesão aos receptores hormonais, podendo atuar como agonistas ou antagonistas do estrogênio, dependendo do sítio de atuação, sendo classificados como SERM's – Moduladores Seletivos dos Receptores Estrogênicos (ALVES & SILVA, 2002). Acredita-se que os fitoestrogênios possam atuar na maioria dos órgãos nos quais estão presentes os receptores estrogênicos. O tratamento clínico com fitoestrogênios tem se destacado para prevenção e tratamento de distúrbios dos sistemas ósseo, cardiovascular e mamas (ROSA LIMA, 2006). Alguns estudos com fitoestrogênios demonstraram a atuação dos mesmos em lipoproteínas (DEWELL et al., 2002) e no tratamento de doenças cardiovasculares (ALBERTAZZI & PURDIC, 2002). Possuem também propriedade de inibição da angiogênese (FOTSIS et al., 1993) e da diferenciação de células de linhagem de câncer (CONSTANTINO & HUBERMAN, 1995; FOTSIS et al., 1995). Além disso, existem estudos sobre as atividades antioxidantes (WEI et al., 1995), anti-hipertensivas e antiinflamatórias (KNIGHT & EDEN, 1995) dos fitoestrogênios.

Nas últimas décadas se tem observado notável aumento na incidência de câncer de mama, especialmente na América do Norte e na Europa Ocidental (FEUER et al., 1993). No Brasil, o câncer de mama é um dos que mais causa morte entre as mulheres. Atualmente, o uso de medicamentos que bloqueiam a ligação dos estrogênios aos seus receptores no epitélio mamário (SERM's) constitui uma estratégia para a prevenção do câncer de mama. Entre esses fármacos, destacam-se os fitoestrogênios (ROSA LIMA, 2006). Essas substâncias despertam muito interesse na tentativa de explicar o fato de as dietas com grande quantidade de plantas estarem associadas à baixa mortalidade em muitas populações devido a essa patologia (SHU et al., 2001). O papel dos fitoestrogênios em modificar o risco de câncer pode não estar associado somente às suas propriedades estrogênicas, mas também por exercer papel mediador em outros eventos bioquímicos relacionados (THAM et al., 1998).

Muitos estudos *in vitro* ilustram o efeito bifásico dos fitoestrogênios em células de cultura. Quando em baixas concentrações, estimulam a proliferação, porém, quanto em concentrações suprafisiológicas, ocorre inibição do crescimento celular. Se um fitoestrogênio “forte” e um estrogênio natural estiverem presentes em concentrações fisiológicas, os fitoestrogênios irão antagonizar a ação do estrogênio, reduzindo a proliferação celular (HARGREAVES et al., 1999). As propriedades anti-estrogênicas e citotóxicas dos fitoestrogênios podem ser avaliadas em algumas linhagens tumorais. O *E-SCREEN* em células MCF-7 pode também ser utilizado para avaliar a atividade estrogênica de um medicamento (PIERSEN, 2003).

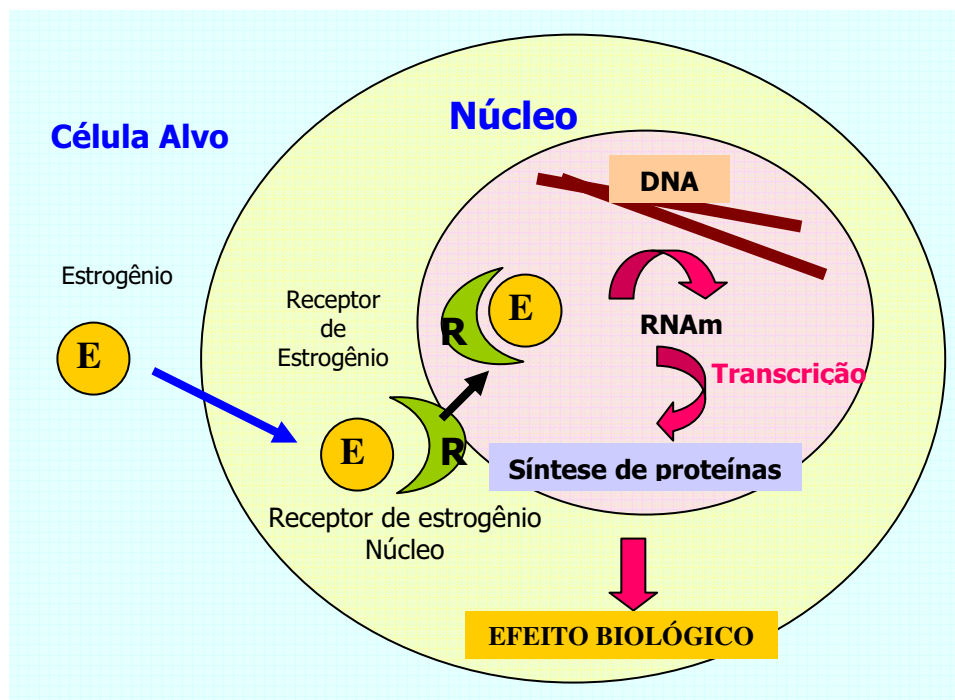


Figura 1: Mecanismo de ação do estrogênio via receptor (adaptado de Alves & Silva, 2002).

Para desenvolver um bioensaio, é necessário escolher qual o efeito será avaliado. A proposta para um bioensaio pode se basear na definição que diz que os estrógenos são substâncias capazes de interferir na proliferação de órgãos do trato genital feminino. Os estrógenos induzem a proliferação dessas células e o e-screen baseia-se nessa propriedade (SOTO et al., 2006). Segundo Rajapakse (2004), de todos os ensaios utilizados para triagem

de substâncias químicas com atividade endócrina, o *e-screen* apresenta o maior nível de complexidade biológica, podendo isso ser considerado como um ponto de eficácia. Muitos fatores devem ser considerados durante o planejamento experimental, desenvolvimento e avaliação da combinação de efeitos estrogênicos e anti-estrogênicos por diferentes mecanismos.

2.8. Atividade citotóxica em célula tumoral humana (MCF7)

O câncer corresponde a um grupo de várias doenças que têm em comum a proliferação descontrolada de células anormais e que pode ocorrer em qualquer local do organismo (TAVARES et al., 2007). As neoplasias vêm sendo indicadas como a terceira causa *mortis* mais freqüente no Brasil (INCA, 2008).

Vários fatores podem estar envolvidos no aumento da incidência do câncer, como o envelhecimento da população, sedentarismo, hábitos alimentares pouco saudáveis, além de fatores genéticos, ambientais e até mesmo inflamatórios. Atualmente, sabe-se que existe susceptibilidade diferencial à carcinogênese, em parte por diferenças genéticas no metabolismo do carcinógeno e/ou por variação na capacidade de reparo do DNA (ANDRADE & PEREIRA, 2007).

Estudos com linhagens de células cancerosas identificaram uma variedade de marcadores moleculares e mutações específicas que podem estar envolvidas na patogênese do câncer. Essas mudanças incluem a hiperexpressão de oncogenes, deleção de genes supressores tumorais ou perda da expressão de genes supressores tumorais (CROCE et al., 1999). Existem muitos outros fatores relacionados ao câncer, como perda de heterozigose, anormalidades na metilação do DNA, altos níveis de atividade da telomerase, entre outros. Com o crescente interesse sobre essa área e as técnicas cada vez mais avançadas, muito ainda está para ser descoberto (APOLINARIO et al., 1997; FONG et al., 1999; WRIGHT & GRUIDL, 2000; YATABE et al., 2000).

A grande incidência de câncer em todo mundo faz com que cada vez mais aumente a busca de pesquisas e terapias, mais seguras e eficazes, para prevenção e combate do mesmo. Apesar dos esforços despendidos, o sucesso no tratamento de tumores tem se mostrado discreto, devido ao grau de agressividade da doença e os mecanismos de escape das células neoplásicas, além da toxicidade causada dos agentes anti-neoplásicos (OLIVEIRA et al., 2005). Continuam em expansão as linhas de pesquisa para novos compostos anti-neoplásicos e sua avaliação em vários sistemas tumorais e cultura de tecidos, com o objetivo de selecionar compostos mais efetivos (FLORÊNCIO et al., 2007). Métodos *in vitro* que medem o potencial citotóxico de drogas continuam sendo desenvolvidos para uma avaliação mais sensível da concentração que danifica componentes, estruturas ou vias bioquímicas celulares, além de permitirem a extrapolação dos dados quantitativos às situações análogas *in vivo* (DEVIIENNE, 2000).

Estudos sobre fitoterápicos na busca de substâncias bioativas de origem natural vêm despertando interesses da comunidade científica e vários trabalhos têm sido publicados confirmando atividades farmacológicas de ervas no tratamento do câncer (OLIVEIRA et al., 2005). Muitas plantas têm sido utilizadas para o tratamento de câncer ao longo da história e, atualmente, estão aumentando as investigações sobre os mecanismos envolvidos nessas atividades farmacológicas. No Brasil, esses estudos são importantes, uma vez que a biodiversidade é extensa e uma parcela da população, que vive em lugares específicos, não possui condições financeiras ou acesso à assistência à saúde (PESSOA et al., 2006).

2.9. Atividade anti-*Leishmania*

As leishmanioses são causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, afetando mais de 12 milhões de pessoas em todo o mundo, sendo estimados de 2 a 3 milhões de novos casos a cada ano (SILVA et al., 2004; BHARATE et al, 2005). Estas doenças são

consideradas um problema de saúde pública, causando significativa morbidade e mortalidade na África, Ásia e América Latina (ROCHA et al., 2003).

O tratamento das leishmanioses é difícil, devido à localização da forma infecciosa dentro dos macrófagos. Os quimioterápicos disponíveis para o tratamento das leishmanioses são, geralmente, caros, de difícil administração e requerem supervisão clínica devido à severidade dos possíveis efeitos colaterais (GRIMALDI & TESH, 1993). Extratos de plantas e seus derivados podem representar uma fonte de novos agentes medicinais (CARVALHO & FERREIRA, 2001; KAYSER & KIDERLEN, 2001) e a urgente necessidade de alternativas de tratamento tem levado pesquisadores a realizarem triagens de produtos naturais para o uso potencial na terapia das leishmanioses e infecções fúngicas (BRAGA et al., 2007).

O Brasil é rico em plantas medicinais e atualmente muitas delas têm sido estudadas para o tratamento de enfermidades causadas por protozoários, como a malária (CHAN-BACAB & PEÑA-RODRÍGUEZ, 2001; KAYSER et al., 2003), doença de Chagas (MUELAS-SERRANO, 2000) e leishmaniose (ROCHA et al., 2005; KVIST et al., 2006). Tendo em vista a magnitude da doença e os problemas relacionados com a quimioterapia existente atualmente (ALVES et al., 2003), se destaca a importância dos estudos sobre a avaliação da atividade leishmanicida de substâncias extraídas de plantas utilizadas na medicina popular brasileira.

2.10. Atividade anti-bacteriana

Em razão do aumento da resistência de microrganismos patogênicos a múltiplas drogas, devido ao uso indiscriminado de anti-microbianos, surge a preocupação para a descoberta de novas alternativas terapêuticas. Os produtos naturais são uma alternativa muito relevante (LOPEZ et al., 2001), uma vez que sempre foram importantes para o descobrimento de novas drogas para o tratamento de infecções (SILVA et al., 2007).

Substâncias isoladas de plantas, cujas estruturas químicas, com raras exceções, apresentam diferenças estruturais em relação aos antibióticos derivados de microorganismos. Os agentes anti-microbianos isolados de plantas podem agir por diversos mecanismos (ativação ou bloqueio enzimático, alteração de estrutura de membrana, ação direta em nível nuclear ou ribossomal, entre outros). Entretanto, a maioria das plantas utilizadas na medicina popular com essa finalidade não teve sua potencialidade terapêutica efetivamente comprovada (GONÇALVES et al., 2005).

3. OBJETIVOS

“A neve e as tempestades matam as flores, mas nada podem contra as sementes”.

(Gibran Khalil Gibran)

Objetivos gerais

Estudar quatro espécies de plantas, pertencentes aos gêneros *Byrsonima* e *Indigofera*, relacionadas no Projeto BIOTA. Avaliar as atividades mutagênica dos extratos, frações e substâncias isoladas, além da atividade anti-bacteriana, citotóxica, anti-*Leishmania* (de substâncias com atividades citotóxica e anti-bacteriana significativas) e fitoestrogênica de substâncias isoladas dessas espécies.

Objetivos específicos

***B. crassa*:**

a) Avaliar as atividades estrogênica, anti-estrogênica e inibidora de aromatase da amentoflavona, substância isolada a partir do extrato metanólico dessa espécie, através do ensaio *e - screen*;

b) Avaliar o potencial anti-bacteriano (difusão em agar e microdiluição), citotóxico e anti-*Leishmania* da amentoflavona.

B. fagifolia:

a) Avaliar a atividade mutagênica dos extratos, frações e substâncias isoladas (ácido gálico, galato de metila, ácido quínico e o ácido 3,4-digaloilquínico) através do Teste de Ames;

b) Avaliar a atividade estrogênica, anti-estrogênica e inibidora de aromatase do ácido gálico isolado dessa espécie através do ensaio *e - screen*;

c) Avaliar atividades biológicas complementares do ácido gálico e do ácido quínico, utilizando técnicas simples, para verificar o potencial citotóxico, anti-bacteriano e anti-*Leishmania*.

I. truxillensis:

a) Avaliar a atividade mutagênica dos extratos, frações e substâncias isoladas (índigo, indirubina, kaempferol-3,7-diraminosídeo) através do teste de Ames; realizar esses ensaios também com a isatina;

b) Avaliar a atividade estrogênica, anti-estrogênica, inibidora de aromatase, citotóxica, antimicrobiana e anti-*Leishmania* do kaempferol diglicosilado isolado a partir do extrato metanólico dessa espécie;

c) Avaliar o potencial anti-bacteriano, citotóxico e anti-*Leishmania* índigo e indirubina. Realizar os mesmos ensaios com a isatina (precursor biossintético dos alcalóides índigo e indirubina).

I. suffruticosa

a) Avaliar a atividade mutagênica dos extratos e frações através do teste de Ames;

b) Avaliar a atividade estrogênica, anti-estrogênica, inibidora de aromatase, citotóxica, anti-bacteriana e anti-*Leishmania* da rutina.

4. MATERIAL E MÉTODOS

“Nenhum pássaro voará alto demais se estiver voando apenas com suas próprias asas”.

(William Blake)

4.1. Droga vegetal: As folhas de *B. crassa* e *B. fagifolia* foram coletadas do Porto Nacional do Estado do Tocantins - Brasil, pela Prof.^a Dr.^a Clélia A. Hiruma-Lima. A autenticidade da amostra foi feita pelo Prof. Eduardo Ribeiro dos Santos, por comparação com arquivos do Herbário da Universidade de Tocantins. A exsicata de *B. crassa* está depositada sob o registro n.º 3377 e a de *B. fagifolia* está depositada sob o registro n.º 6398. As folhas de *I. truxillensis* e *I. suffruticosa* foram coletadas em Rubião Júnior, na cidade de Botucatu, SP - Brasil e identificadas pelo Prof.^o Jorge Yoshio Tamashiro. A exsicata da primeira foi depositada no Herbário da Universidade de Campinas, sob o registro número 31.827 e da segunda, sob o número 129.598.

4.2. Extratos, frações e substâncias isoladas: As espécies relacionadas nesse trabalho (*B. crassa*, *B. fagifolia*, *I. truxillensis* e *I. suffruticosa*) fazem parte da relação de plantas do projeto Biota - FAPESP. As extrações foram realizadas no Laboratório de Fitoquímica do Instituto de Química da UNESP - SP, sob a coordenação do Prof. Dr. Wagner Vilegas.

a) *B. crassa* e *B. fagifolia*: Aproximadamente 2 kg de folhas de *B. crassa* foram secos, triturados em moinho de facas e submetidos à exaustiva extração por maceração, em recipiente com tampa, contendo inicialmente clorofórmio, por 48 horas, em temperatura ambiente e sob agitação ocasional. Após a filtração, o material remanescente foi extraído com metanol, sob as mesmas condições. Após o processo de extração (figura 2), a solução

extrativa foi filtrada em papel e o restante do solvente foi retirado sob pressão reduzida, obtendo-se o extrato metanólico (158,3g ou 7,9%). Também foram utilizados 2kg de folhas de *B. fagifolia*, os quais foram submetidos aos mesmos procedimentos de extração e concentração, sendo obtidos os extratos clorofórmico (47,3g ou 2,37%) e metanólico dessa espécie (24,6g ou 1,23%).

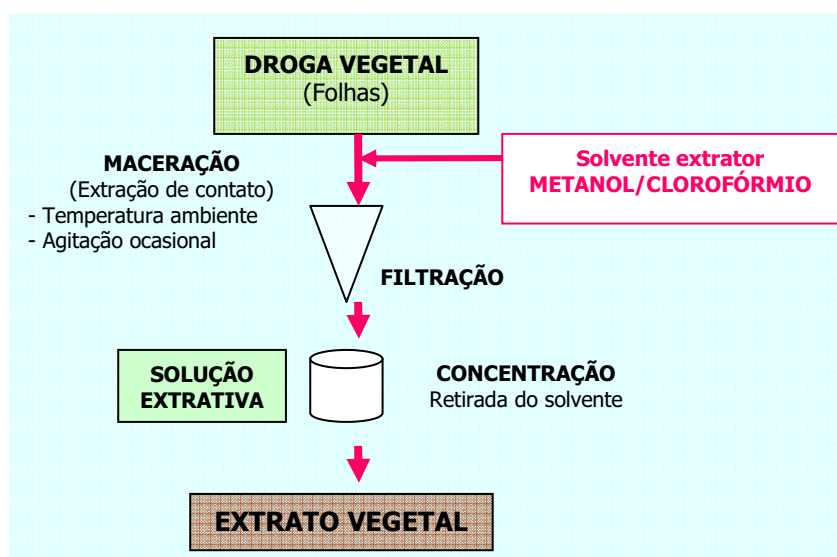


Figura 2: Processos gerais para a obtenção dos extratos vegetais.

Uma porção de 10g do extrato metanólico de *B. crassa* foi ressuspensa em água e extraída com acetato de etila (água/acetato de etila 1:1 v/v) em três tempos, produzindo as frações acetato de etila (4,8g) e aquosa (3,0g). Análises posteriores por cromatografia em camada delgada revelaram que os flavonóides permaneceram basicamente na fração acetato de etila, enquanto os derivados de catequina e os taninos permaneceram na fração aquosa. A fração acetato de etila (4,8g) foi dissolvida em 15mL de metanol e submetida à centrifugação. O sobrenadante (4,1g) foi fracionado em coluna Sephadex LH-20 (57 x 3,0 cm d.i.), utilizando metanol como eluente. Foram obtidas 183 frações de 20 mL cada uma, as quais foram reunidas em 26 grupos após análises por cromatografia em camada delgada. O grupo das frações 136-141 (com rendimento de 95g) foi purificado em coluna de celulose utilizando-se como eluente a mistura CHCl_3 / Metanol (80:20 v/v), permitindo o isolamento de

uma substância que, quando aplicada em cromatografia em camada delgada e revelada com NP/PEG, mostrou uma mancha de cor amarelo ouro, indicando que se tratava de um flavonóide. A análise realizada com detecção por espectrometria de massas indicou um PM de 538, compatível com a fórmula $C_{30}H_{18}O_{10}$, o que sugeriu ser a estrutura um biflavonóide. Outras análises, utilizando ressonância magnética nuclear e experimentos bidimensionais HMQC e HMBC, além da comparação dos resultados com os dados da literatura (AGRAWAL et al., 1989; HARBONE, 1996), confirmaram a estrutura como sendo a amentoflavona (figura 3).

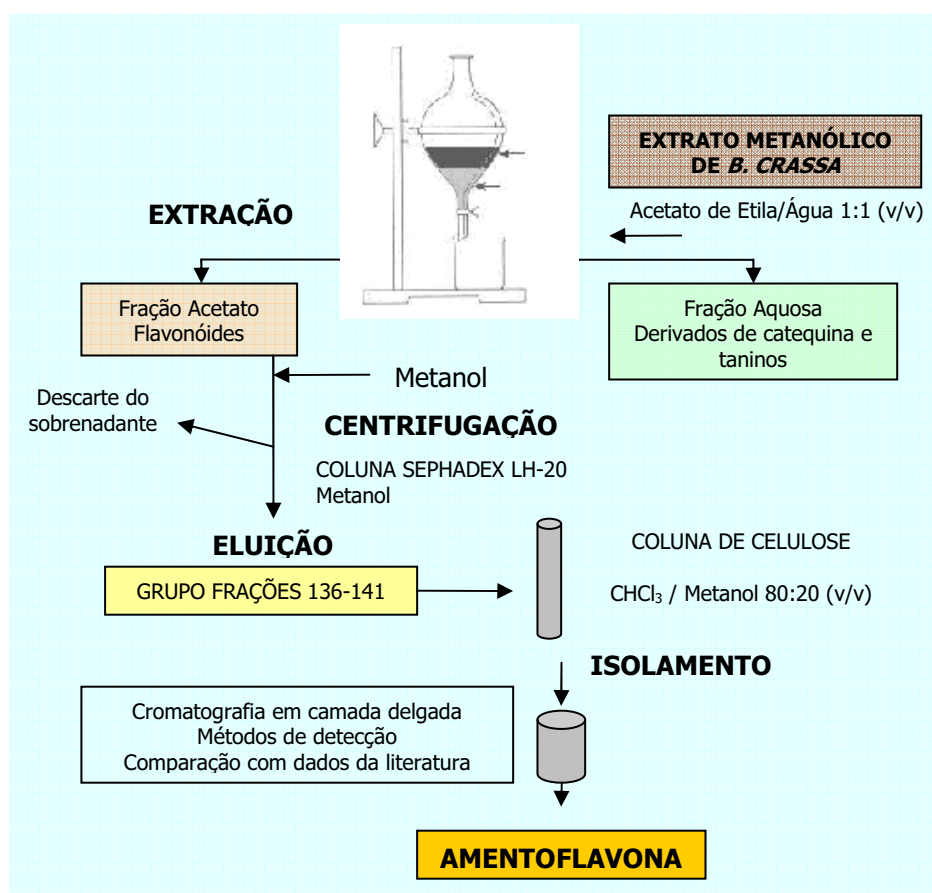


Figura 3: Isolamento da amentoflavona.

O mesmo procedimento foi realizado com o extrato metanólico de *B. fagifolia*. A análise das frações 132-138 (83mg) do extrato metanólico de *B. fagifolia* em coluna de sílica gel (15cm x 1,0cm d.i.), empregando como fase móvel a mistura de $CHCl_3/MeOH$ 85:15 (v/v)

resultou no isolamento de um composto esverdeado após a revelação com anisaldeído/sulfúrico. A análise por RMN de ^1H mostrou que este se tratava do ácido gálico. Na tentativa do isolamento dos derivados do ácido galoilquínico foram empregadas várias metodologias para isolamento de compostos polares como HSCCC e DCCC, no entanto, nenhuma das técnicas mostrou-se efetiva. Alternativamente, avaliou-se a possibilidade do isolamento destes compostos por HPLC preparativo. Após inúmeras análises cromatográficas nas diferentes condições, atribuiu-se como sendo a melhor separação empregando-se Coluna C18 Dynamax (250 x 41,1 mm d.i. x 8 μm). A fase móvel usada foi acetonitrila (A) e água (B) no modo gradiente: A 5% \rightarrow A 23% (120 min); A23% \rightarrow A 60% (200 min); A60% \rightarrow A100% (240 min) Fluxo de 15,0 ml min^{-1} . Injetou-se 2mL da Fração AcOEt (1,5g) dissolvidos em 10 mL de água, obtendo-se 27 frações.

As análises de espectros de RMN ^1H (mono e bidimensionais em DMSO-d_6), RMN de ^{13}C das frações F3, F4, F6, F8, F11 e F12 forneceram respectivamente ácido gálico, 3,4,5-triidroxibenzeno, ácido 3,4-digaloilquínico, ácido 3,5-digaloilquínico, ácido 3,4,5-trigaloilquínico ou pirogalol e ácido 1,3,4,5-tetragaloilquínico (figura 4).

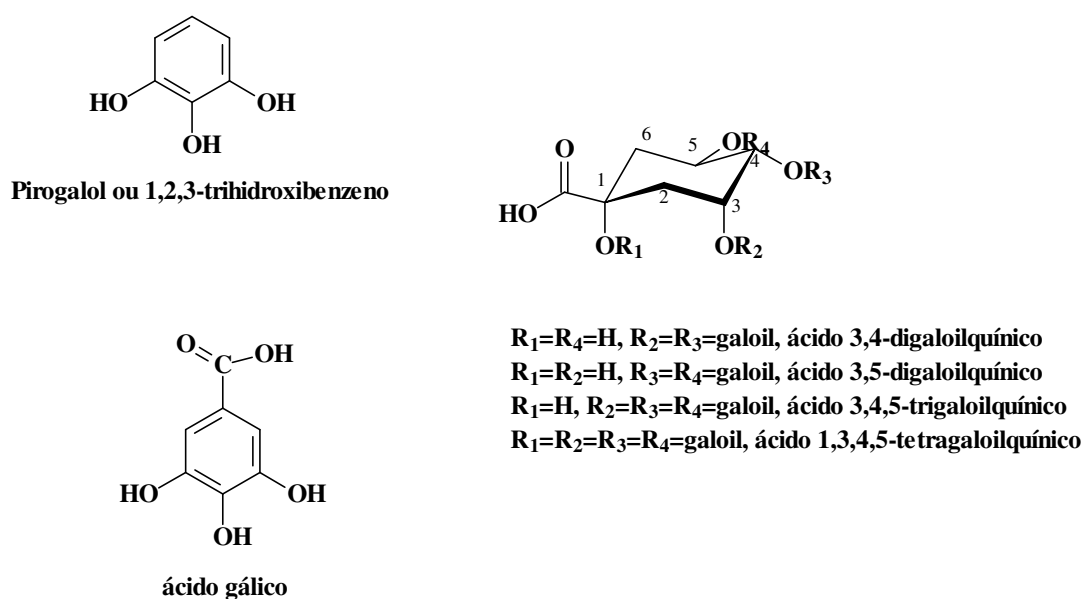


Figura 4: Estruturas das substâncias isoladas de *B. fagifolia* e identificadas pela análise de espectros RMN.

Partes aéreas de *I. truxillensis* (1,5kg) foram secas em estufa a 40°C por uma semana, trituradas em moinho de facas e submetidas à extração por maceração com clorofórmio e metanol sucessivamente, em temperatura ambiente. Após filtração das soluções extrativas, os solventes foram retirados a 40°C sob pressão reduzida, obtendo-se os extratos metanólico (110g ou 7,3%) e clorofórmico (43g ou 3,0%). O mesmo procedimento foi realizado para *I. suffruticosa*, obtendo, a partir de 1,1kg de partes aéreas, os extratos metanólico (30,3g ou 2,7%) e clorofórmico (13,6g ou 1,2%).

O extrato metanólico foi fracionado por cromatografia de permeação em gel (CPG) utilizando Sephadex como adsorvente. As primeiras frações coletadas foram reunidas e denominadas “fr. inicial” (46,4 %). As frações intermediárias constituídas basicamente por flavonóides (manchas amarelas características com revelador NP/PEG) foram reunidas e denominadas “fr. flavonóides” (50,2 %). As frações finais eram coloridas (azul, rosa e tons de marrom), características dos indigóides presentes no gênero *Indigofera*, sendo reunidas e nomeadas “fr. alcalóides” (3,2 %). A partir da purificação dessas frações foram obtidos os constituintes mais importantes da espécie (figura 5).

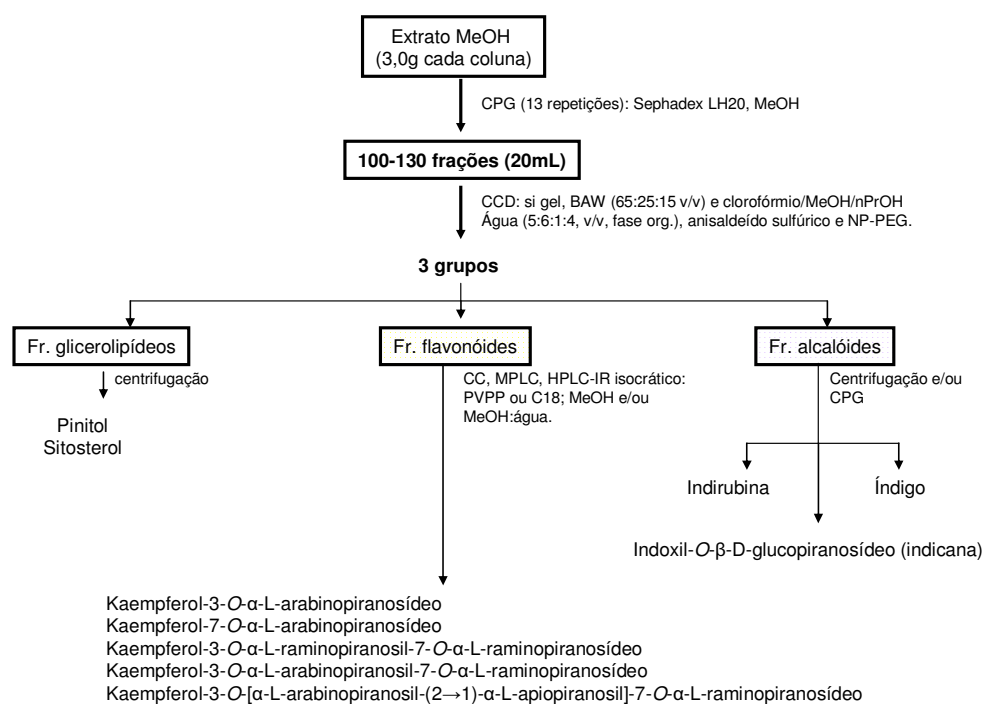


Figura 5: Esquema geral: processamento do extrato metanólico de *I. truxillensis*.

O conjunto de técnicas cromatográficas de isolamento, associado à análise de espectros obtidos por Ressonância Magnética Nuclear (RMN), juntamente com experimentos de Espectrometria de Massas (EM), Infravermelho (IV) e Ultravioleta (UV), levaram à identificação das substâncias isoladas. O índigo foi caracterizado pela comparação de Rf's (fatores de retenção) por cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC) com padrão autêntico e por experimentos de EM, IV e UV. As frações ricas (flavonóides e alcalóides) foram avaliadas quanto à mutagenicidade, assim como algumas substâncias isoladas a partir das mesmas: indirubina, índigo (figura 6) e kaempferol-3,7-diraminoídeo (figura 7).

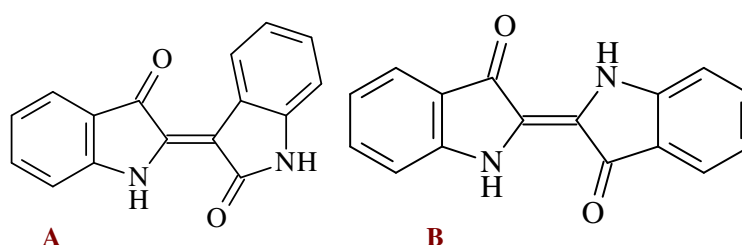


Figura 6: Estruturas químicas da indirubina (A) e do índigo (B), principais alcalóides isolados de *I. truxillensis*.

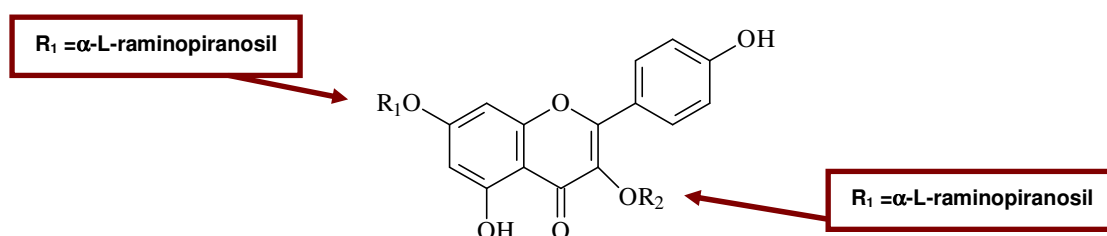


Figura 7: Estrutura química do kaempferol-3,7-diraminosídeo isolado do extrato metanólico de *I. truxillensis*.

O extrato MeOH de *I. suffruticosa* foi fracionado por CPG. As frações obtidas foram analisadas por CCDC e reunidas em 3 grupos de frações ricas em: fr. inicial (45 %), fr. flavonóides (20 %) e fr. alcalóides (35 %). A purificação dessas frações possibilitou o isolamento e identificação (RMN, EM, IV e UV) de compostos nitrogenados, de um ciclitol, de flavonóis glicosilados derivados da quercetina, do ácido gálico e de um esteróide glicosilado, conforme demonstra a figura 8.

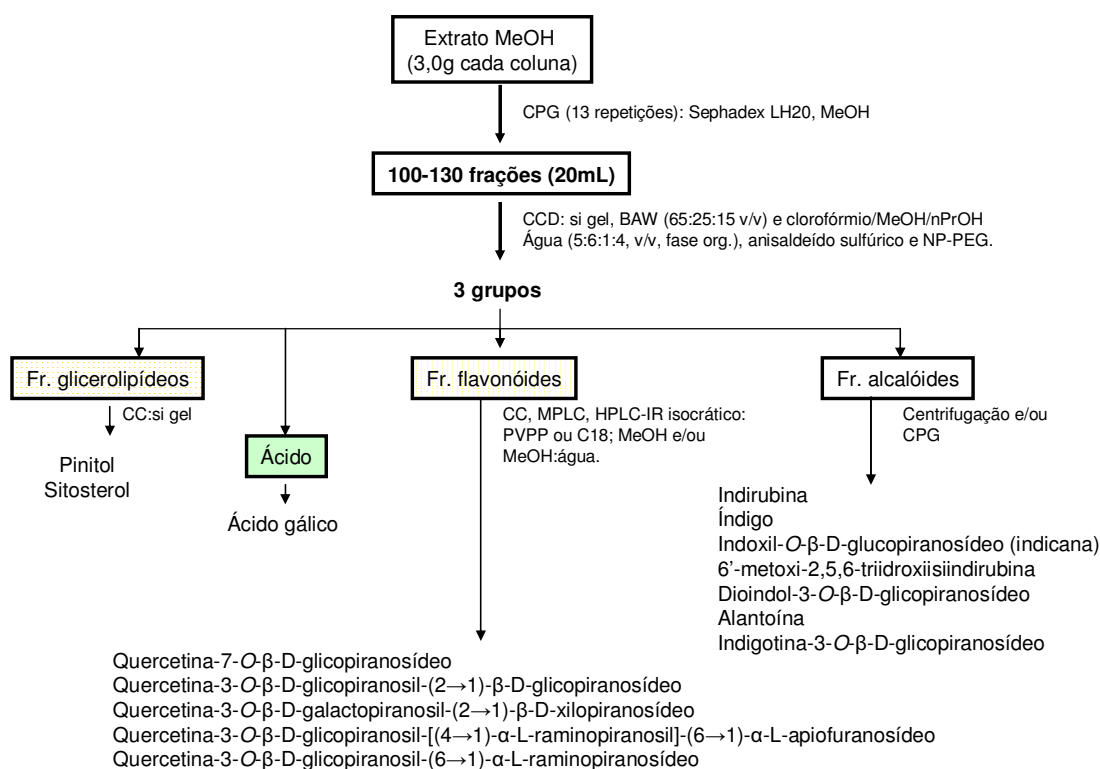


Figura 8: Esquema geral: processamento do extrato metanólico de *I. suffruticosa*.

* gradiente de AcOEt/*n*-BuOH/H₂O 3,8:1,2:5,0 - 3,5:1,5:5,0 (v/v), FM: fase orgânica; 850 rpm; fluxo 1 mL/min.

Na espécie *I. suffruticosa* há maior quantidade de alcalóides bis-indólicos (principalmente índigo e indirubina, 35%) que em *I. truxillensis* (3%). Além disso, há uma maior diversidade de compostos nitrogenados em *I. suffruticosa*. Em relação aos flavonóides, *I. suffruticosa* apresenta derivados glicosilados da quercetina (29%), enquanto em *I. truxillensis* os flavonóides, também glicosilados, são derivados do kaempferol (50%). Nos ensaios biológicos, apenas as substâncias isoladas em maior quantidade e aquelas ainda não descritas na literatura foram avaliadas. As estruturas das substâncias isoladas das espécies de *Byrsonima* e *Indigofera* e avaliadas nos ensaios biológicos estão representadas na figura 9.

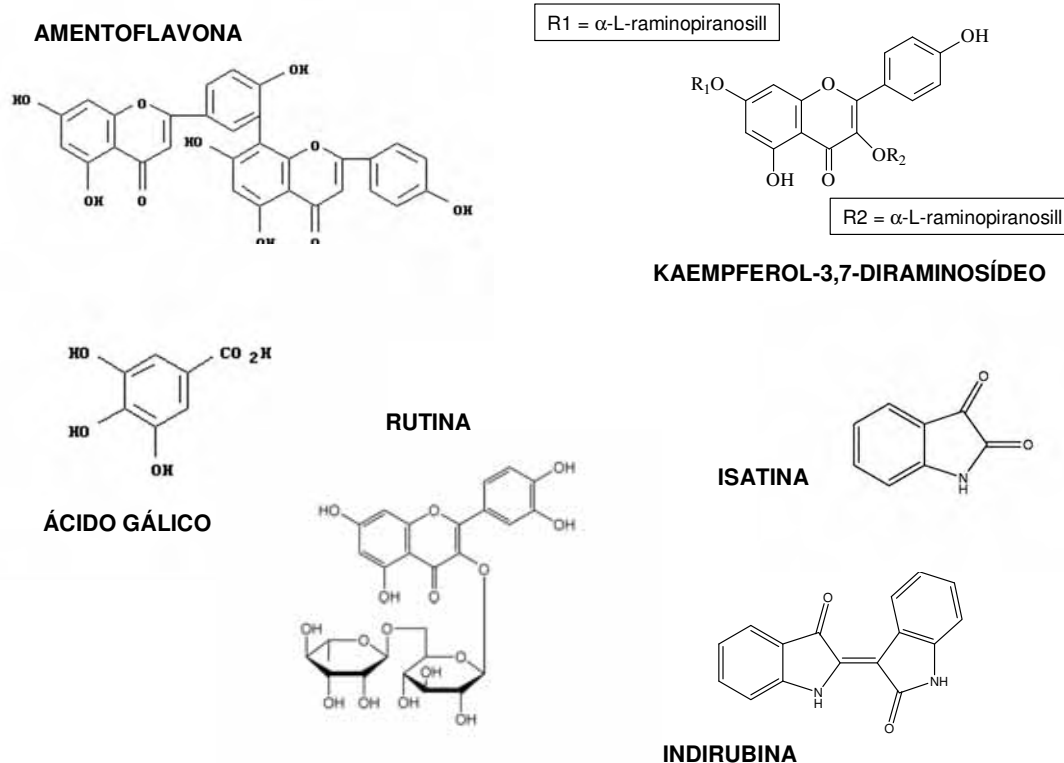


Figura 9: Estruturas das substâncias avaliadas nos ensaios biológicos.

4.3. Ensaios de mutagenicidade: Teste de Ames (Maron & Ames, 1983)

a) Extratos, frações e substâncias isoladas: Os ensaios de mutagenicidade *in vitro* (Teste de Ames) foram realizados com:

-*B. fagifolia*: a) Extratos (metanólico e clorofórmico); b) frações do extrato metanólico (acetato e aquosa); substâncias isoladas (ácido gálico, galato de metila, ácido quínico e o derivado 3,4-digaloil quínico);

-*I. truxillensis*: a) Extratos (metanólico e clorofórmico); frações enriquecidas do extrato metanólico (flavonóides, alcalóides e glicerolípídeos); substância isolada (kaempferol-3,7-diraminosídeo); foram testados os alcalóides índigo e indirubina (comuns às duas espécies de *Indigofera*); foi testada também a isatina, uma molécula precursora de indirubina;

-*I. suffruticosa*: a) Extratos (metanólico e clorofórmico); b) frações enriquecidas do extrato metanólico (flavonóides, alcalóides e glicerolípídeos); as massas das substâncias

isoladas não foram suficientes para a realização dos testes. A rotina não foi avaliada pelo teste de Ames.

b) Linhagens de *S. typhimurium*: Foram utilizadas as linhagens TA98, TA97a, TA100 e TA102 de *S. typhimurium*, gentilmente cedidas pelo Dr. Bruce Ames, da Universidade Berkeley, Califórnia, USA. A linhagem TA98 apresenta mutação no gene D (hisD3052), e detecta compostos mutagênicos que deslocam o quadro de leitura do DNA. A linhagem TA100 apresenta mutação his G46 e detecta agentes que causam substituições, principalmente em pares G-C. A linhagem TA102 contém a mutação no gene hisG, detectando agentes químicos e radiações, além de agentes *cross-link*, como a mitomicina C. A linhagem TA97a também detecta mutágenos do tipo *frameshift*, apresentando mutação no gene hisD6610 (MARON & AMES, 1983).

c) Manutenção, estoque e características genéticas: As linhagens foram estocadas em tubos de congelamento (1,5mL) a -70°C, para manutenção das características genéticas. Para cada 0,9 mL de cultura, foram acrescentados 0,1mL de DMSO (crioprotetor). As características genéticas das cepas foram verificadas antes da estocagem, de acordo com as metodologias de Maron & Ames, (1983). O meio de congelamento e as técnicas de verificação das características genéticas estão descritos no anexo I desse trabalho.

d) Preparo dos inóculos: Com alça de inoculação, pequena quantidade de cultura estoque foi semeada em 30 mL de caldo nutriente (Oxoid nº2), incubado a 37°C por 12-16 h, com agitação de 160 g, de modo a obter densidade de 1×10^9 bactérias/mL.

e) Meios de cultura e preparo da mistura S9: Todos os meios e reagentes foram preparados de acordo com Maron & Ames (1983) e estão descritos no anexo I desse trabalho. Foi utilizada a fração microssomal S9 de fígado de ratos induzidos com arocloror 1254, um indutor de enzimas (MOLTOX - USA). Esta fração revela se o agente teste precisa ser metabolizado para se tornar mutagênico. À fração liofilizada foram acrescentadas

soluções de MgCl₂ 0,4M, KCl 0,4 M, glicose-6P 1M, NADP 0,1M, tampão fosfato 0,2M e água destilada, todos mantidos em gelo durante o experimento.

f) Controles: O controle negativo foi feito com o solvente dos extratos vegetais (DMSO). Os controles positivos, para confirmação da reversão, foram: 4-nitrofenilenodiamina (NPD) para TA98 e TA97a (10µg/placa), azida sódica para TA100 (1,25 µg/placa) e mitomicina C para TA102 (0,5µg/placa). Nos ensaios com ativação metabólica, foi utilizado 2-antramine para todas as linhagens (1,25µg/placa). Essas substâncias foram obtidas da Sigma.

g) Ensaio de mutagenicidade: Foi usada a metodologia de pré-incubação com e sem ativação metabólica, desenvolvida por Maron e Ames (1983) - (figura 9). Diferentes concentrações dos extratos e frações dos vegetais foram misturadas a 0,1 mL de cultura de bactérias e 0,5 mL de tampão fosfato pH 7,4 (ou 0,5 mL da mistura S9 em ensaios com ativação metabólica) e incubadas por 20-30 minutos a 37° C. As concentrações variaram entre: a) *B. fagifolia* - 0,78 e 6,44 mg/placa para os extratos; 0,21 a 2,66 mg/placa para as frações; 0,08 a 1,20 mg/placa para as substâncias isoladas; b) *I. truxillensis* e *I. suffruticosa* - 1,25 a 7,5 mg/placa para os extratos; 0,12 a 1,5 mg/placa para as frações; 0,125 a 1,0 mg/placa para as substâncias. Após esse tempo, adicionou-se 2mL de agar superfície ("top agar") suplementado com traços de histidina e biotina, se homogeneizou levemente e se plaqueou em meio mínimo glicosado. Após solidificação do "top-agar", as placas foram incubadas por 48 h, a 37 °C. Após esse período, foi realizada a contagem do número de colônias revertentes por placa. O ensaio foi realizado em triplicata em três experimentos independentes.

h) Análise estatística: Os dados foram analisados com o programa estatístico SALANAL, elaborado e gentilmente cedido pelo Dr. L.Myers, do Research Triangle Institute, Carolina do Norte, USA, através da Dra. Maria Inês Sato (CETESB). Este programa

permite avaliar o efeito dose-resposta pela análise de variância (ANOVA - Test F) entre as médias do controle negativo e os testes, seguindo uma regressão linear. Foram também calculadas as razões de mutagenicidade (RM), que são a média do número de revertentes do teste (espontâneos + induzidos) dividida pela média de revertentes do controle negativo. O teste foi considerado positivo quando a RM foi maior ou igual a 2, além de um efeito dose-resposta significativo. O teste foi negativo quando não induziu aumento significativo de revertentes e suas RM foram menores que dois.

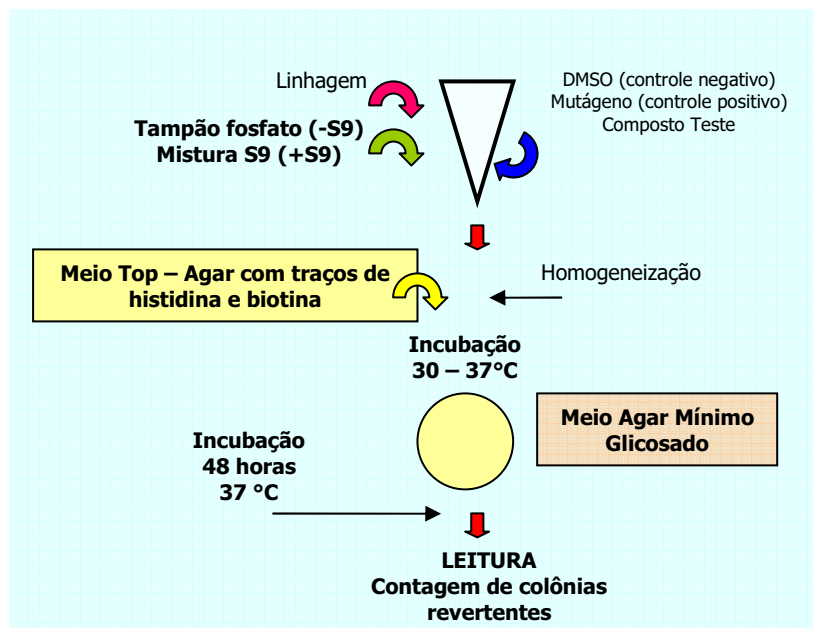


Figura 10: Teste de Ames, sem e com ativação metabólica.

4.4. Ensaio de atividade fitoestrogênica: e-screen (Villalobos et al., 1995)

Todos os procedimentos técnicos foram realizados no laboratório de Investigações Biomédicas do Departamento de Medicina Ambiental da Universidade de Granada (Espanha), sob a orientação dos pesquisadores Nicolás Olea, Marieta Fernández e José Manoel Molina. O método e-screen foi inicialmente descrito por Soto et al. (1992) e modificado por Villalobos et al. (1995). Os ensaios denominados como “atividade fitoestrogênica” compreenderam: atividade estrogênica, anti-estrogênica e atividade de inibição de aromatase. O clone BUS foi utilizado para os experimentos, uma vez que essas

células possuem maior expressão de receptores e, portanto, maior potencial de resposta às substâncias estrogênicas.

a) Substâncias avaliadas: As substâncias foram amentoflanova (*B. crassa*), ácido gálico (*B. fagifolia*), kaempferol-3,7-diraminosídeo (*I. truxillensis*) e rutina (*I. suffruticosa*).

b) Meios de cultura para células MCF7: O meio utilizado para a cultura de células MCF7 foi o DMEM (Dulbecco's modification of Eagle's medium. A composição e o preparo do meio estão descritos no anexo II desse trabalho. De acordo com a etapa experimental, esse meio podia conter ou não o indicador vermelho de fenol. O soro fetal bovino (com ou sem a presença de estrogênios) foi acrescentado na ocasião do uso, na proporção de 5 - 10%, constituindo o denominado "meio de cultura completo". O soro fetal bovino, distribuído em alíquotas, foi inativado antes da utilização (37°C, 1 h).

c) Cultura e subcultura de células MCF7: As condições de incubação foram 37°C, sob tensão constante de CO₂ (5%), as quais foram consideradas como padrão. As subculturas foram realizadas a cada 5 dias. Não foram utilizadas células com repiques superiores a 5, uma vez que as células MCF7 (clone BUS) perdem seu potencial de resposta ao estrogênio com repiques sucessivos. Após a retirada do meio de cultura antigo, a garrafa foi lavada com tampão PBS a 37°C. Foi acrescentado 0,5 mL de uma solução de 0,05% de tripsina e 0,01% de EDTA (Sigma, St. Louis, MO, USA) e PBS, na proporção 1:1 v/v para que as células se desprendessem. Foram acrescentados 1,5 mL de meio de cultura completo, para inativação da tripsina e 3 gotas dessa suspensão celular foram transferidas para garrafas contendo 10 mL de meio. Submeteram-se às condições padronizadas de incubação das células até a preparação da próxima subcultura.

d) Estoques: O estoque foi feito a partir de uma subcultura normal, entre o terceiro e quarto repique. Após a lavagem com PBS, foram acrescentados 0,5 mL de solução de

tripsina-EDTA/PBS e, após o desprendimento, foram acrescentados 10 mL de meio de cultura completo. A suspensão celular foi centrifugada a 2000 rpm por 5 min, para a obtenção do *pellet*, ao qual foi adicionada a solução de congelamento (6 mL de meio de cultura, 3 mL de soro fetal bovino e 1 mL de DMSO). O volume final foi aliqotado em ampolas de congelamento até o volume de 1,0 mL. Procedeu-se o congelamento gradativo (-20 °C por 3 h; -70 °C por 3 h; nitrogênio líquido para estocagem definitiva).

e) Descongelamento de estoques: A ampola de congelamento retirada do nitrogênio líquido foi submetida ao descongelamento gradativo. O conteúdo foi colocado em tubo de centrífuga estéril (15 mL) e lavado com 10 mL de meio de cultura completo (sob centrifugação a 1000 rpm). O sobrenadante foi descartado e, ao *pellet*, foi acrescentado 2 mL de meio de cultura completo. Foram transferidas 3 gotas da suspensão celular em garrafas novas contendo 10 mL de meio, as quais foram incubadas nas condições previamente descritas.

f) Obtenção do soro livre de hormônios: A retirada dos estrogênios do soro fetal bovino é uma etapa importante. Os fitoestrogênios, chamados “hormônios fracos”, têm ação agonista ou antagonista ao estrogênio endógeno. Na presença de altas concentrações de estrogênio, inibem a proliferação celular, mas, na ausência do mesmo, estimulam a proliferação de células em alguns tecidos (como é o caso das células de mama). No ensaio de proliferação celular é preciso que o soro esteja livre do estrogênio endógeno.

A técnica consistiu em incubar 500 mL de soro a 56 °C (banho-Maria) por 1 h para a inativação das proteínas plasmáticas. Aproximadamente 25g (5% do volume total de soro) de carvão ativado (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA) foi adicionado a 240 mL de água destilada e aliqotado em tubos de centrífuga em um volume de 40 mL cada um. A suspensão foi submetida à centrifugação (3000 rpm por 10'). Esse procedimento foi repetido 3 x com água. Os sobrenadantes de lavagem foram descartados e substituídos pelo mesmo

volume de uma solução de dextrana T70 (0,5% do volume total de soro), utilizando os mesmos tubos de centrífuga. Após a centrifugação, descartou-se o sobrenadante e o soro a ser tratado foi adicionado ao carvão-dextrana em cada tubo de centrífuga. A mistura carvão-soro foi submetida à incubação a 37°C, sob agitação, por 1 h. Após a centrifugação, o sobrenadante foi filtrado por 3x em filtro 0,22 µ (Millipore) e estocado a -70°C até o momento do uso.

g) Contagem de células MCF7: As garrafas apresentando crescimento celular confluyente foram utilizadas. Foi preparada uma suspensão celular (conforme procedimentos descritos anteriormente, utilizando meio completo com indicador), a qual foi ajustada para obter a concentração de 4×10^4 células/mL. Foram distribuídas alíquotas de 1 mL de suspensão celular/cavidade em placas de 24 cavidades. As placas foram incubadas nas condições anteriormente descritas por 24 h. As etapas de preparação das placas e incubação são preliminares para todos os experimentos de e-screen (atividade estrogênica, anti-estrogênica na presença de estradiol e inibição de aromatase).

h) Preparo das substâncias: Cada substância foi inicialmente dissolvida em etanol absoluto (solução estoque). A partir de uma alíquota da solução estoque, foram feitas diluições seriadas para obtenção das concentrações, utilizando DMEM sem indicador completo (5 a 10 % de soro livre de estrogênios). A concentração final de solvente não ultrapassou 1 % do volume final/cavidade (VILLALOBOS et al., 1995). As concentrações variaram entre 10^{-5} a 10^{-9} M, em um total de 5 concentrações diferentes. Foram realizados 3 experimentos independentes, com 4 replicatas para cada concentração.

i) Ensaio de estrogenicidade: O meio de cultura utilizado em todas as etapas foi o DMEM sem indicador completo (soro livre de hormônios). Após a retirada do meio de cultura anterior, foram acrescentadas as diluições das substâncias. O controle negativo consistiu em células e a concentração máxima de solvente em meio; O controle positivo consistiu em

células na presença de $17\beta\text{-E}_2$ (10^{-10} M) e meio. Após 6 dias de incubação, a placa foi submetida à técnica colorimétrica de sulforodamina-B para a determinação da proliferação celular. Também foi elaborada uma curva dose-resposta de $17\beta\text{-E}_2$ com 15 concentrações, variando entre 0,01 pM - 10nM, em quatro replicatas (VILLALOBOS et al., 1995). Os resultados obtidos foram relacionados com a curva do $17\beta\text{-E}_2$ em concentrações ótimas através do cálculo dos parâmetros de atividade estrogênica (figura 10). As substâncias com atividade estrogênica foram reavaliadas na presença de um antagonista conhecido (Pure Antiestrogen ICI 182,780 - Astra-Zeneca Pharmaceuticals, London, United Kingdom), na concentração de 10^{-6} M, para confirmação de mecanismo via receptor. Após incubação por 6 dias, os mesmos procedimentos de leitura foram realizados e os parâmetros de proliferação calculados.

j) Ensaio de anti-estrogenicidade: A preparação do ensaio de anti-estrogenicidade consistiu na mesma seqüência de procedimentos para o ensaio de estrogenicidade, sendo acrescentada, antes da incubação, a concentração de 50pM/cavidade de uma solução de $17\text{-}\beta$ estradiol. Após incubação por 6 dias, os mesmos procedimentos de leitura foram realizados e os parâmetros de proliferação calculados para verificar se as substâncias tinham a capacidade de inibir a ação do estradiol *in vitro*.

k) Ensaio de inibição de aromatase: Esse ensaio consiste em uma modificação do ensaio e-screen pela adição de testosterona ao meio, uma vez que a atividade da enzima aromatase é caracterizada pela conversão da testosterona em 17β -estradiol, o qual induz a proliferação celular. Foram adicionados 100 nM de testosterona ao meio de cultura na presença de diferentes concentrações das substâncias (10^{-9} a 10^{-5} M) e a resposta foi avaliada pela determinação do aumento da proliferação celular.

l) Leitura das placas com sulforodamina B: O meio de cultura foi retirado e a placa foi lavada com PBS em temperatura ambiente. Para fixação das células, foi utilizada uma

solução de ácido tricloroacético 10 % (gelado) e a placa foi incubada a 4°C e ausência de luz (1 h). Depois desse intervalo, a placa foi lavada com água de torneira em temperatura ambiente e deixada em repouso para secagem. Em seguida, aplicou-se uma solução de sulforodamina-B (Sigma-Aldrich Inc., St Louis, MO, USA) a 0,4 % em ácido acético 1 %, incubando-se por 30 min a 4°C na ausência de luz. Após lavagem com ácido acético 1 %, a placa foi deixada em repouso para secagem. Foram adicionados 500 µL/cavidade de tampão base TRIS 10 mM (pH 10,5). O conteúdo solubilizado foi transferido em 12 replicatas para placa de 96 cavidades e a leitura foi realizada em leitor de ELISA (Titertek Multiscan apparatus, Flow, Irvine, CA) em um comprimento de onda de 492 nm.

m) Análise dos dados: Após a leitura das placas, foram determinados os parâmetros de atividade estrogênica. Um dos parâmetros calculados foi o efeito proliferativo (EP), que estabelece a taxa máxima de proliferação induzida pela substância em células MCF7-BUS. Esse parâmetro é obtido pela relação entre a taxa de proliferação apresentada pela substância avaliada e aquela apresentada pelo controle negativo (apenas células, meio de cultura sem vermelho de fenol com soro livre de estrogênios e solvente na proporção utilizada na maior concentração avaliada para os testes). Outro parâmetro estabelecido é a chamada eficácia proliferativa relativa (EPR), que estabelece uma relação entre a taxa máxima de proliferação da substância avaliada e taxa máxima obtida pelo 17 β-estradiol. O resultado é expresso em porcentagem, estimando-se 100 % para a taxa do estradiol. Por último, se estabelece também a potência proliferativa relativa (PPR), calculada como a relação existente entre a concentração em que a substância apresenta sua máxima capacidade proliferativa e aquela em que o estradiol apresenta seu máximo efeito proliferativo. Os resultados também são expressos em porcentagem, estimando-se 100 % para o estradiol. Para os cálculos desses parâmetros foram utilizadas fórmulas e funções do Excel. Posteriormente, os parâmetros obtidos foram submetidos à análise de variância ANOVA (assumindo $p < 0,05$) seguida pelo pós-teste de Dunnett (comparação com o controle

negativo). Os resultados (parâmetros) foram expressos pela média \pm desvio padrão de três experimentos independentes, quatro replicatas experimentais e doze replicatas de leitura. As análises estatísticas e os gráficos dose-resposta foram elaborados utilizando-se funções do Excel, Origin 6.0 Professional e Graph Pad Prism 5 (Graph-Pad Software Inc., San Diego, CA, USA).

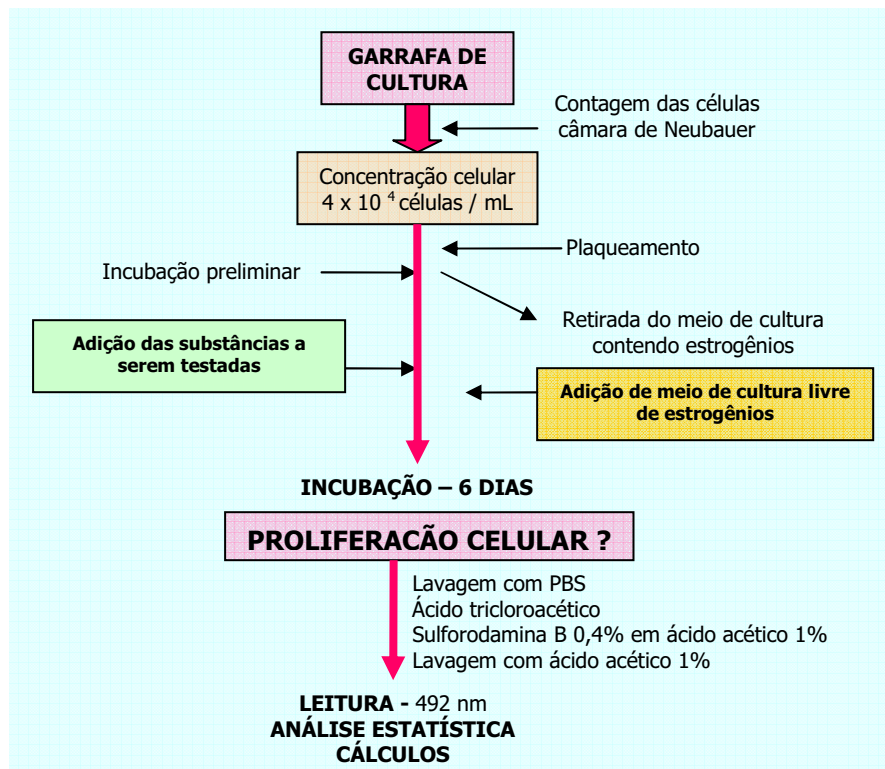


Figura 11: Etapas do ensaio de proliferação celular (*e - screen*).

4.5. Ensaios de citotoxicidade (Skehan et al., 1990)

a) Substâncias avaliadas: As substâncias avaliadas foram: amentoflavona, kaempferol-3,7-diraminosídeo, rutina, além do ácido gálico e ácido quínico, índigo, indirubina e isatina. Após a dissolução em DMSO, as substâncias foram diluídas em meio para atingirem, após a aplicação na placa, 8 concentrações finais variando entre 3,9 e 500 $\mu\text{g/mL}$. Concentrações superiores se mostraram inviáveis ao teste devido à precipitação das substâncias.

b) Cultura de células MCF7: As culturas de células MCF7 clone ATCC foram processadas com a mesma metodologia utilizada para os ensaios de proliferação, utilizando somente meio de cultura completo com vermelho de fenol (DMEM com 10 % de soro fetal bovino). Os repiques foram realizados a cada cinco dias em garrafas de cultura celular, a partir de estoques elaborados conforme metodologia já descrita para células MCF7 nos ensaios e-screen. A composição do meio e das soluções estão no anexo II.

c) Preparação da suspensão celular: Após a lavagem da garrafa com PBS, foram acrescentados 0,5 mL da solução de tripsina-EDTA/PBS (1:1 v/v) para que as células se desprendessem. Em seguida, foram adicionados 1,5 mL de meio para a inativação da tripsina. A suspensão celular foi submetida à contagem em câmara de Neubauer e ajustada a uma concentração celular de 5×10^6 células/mL, utilizando meio de cultura completo. Foram distribuídos 100 μ L de suspensão celular/cavidade em microplacas de 96 cavidades, proporcionando uma concentração final de 5×10^5 células/cavidade. As microplacas foram incubadas a 37 °C em condições padrão (24 h).

d) Curva de toxicidade do solvente: As substâncias testadas foram previamente dissolvidas em DMSO. Foi elaborada uma curva de toxicidade desse solvente em contato com as células MCF7 clone ATCC. De acordo com a curva de toxicidade do solvente, verificamos que o limite permitido no experimento seria inferior a 1 %. O gráfico de toxicidade do DMSO se apresenta juntamente com os demais resultados desse trabalho.

e) Ensaio de citotoxicidade: Foram acrescentadas as diluições das substâncias às microplacas. Após 24, 48 e 72 h de incubação (condições padrão), as microplacas foram submetidas aos procedimentos adequados para a leitura e determinação da citotoxicidade, empregando a metodologia de sulforodamina-B (Skehan et al., 1990). Além dos testes, foram realizados os controles: negativo (células e a concentração máxima de solvente em

meio) e positivo (solução de 20 µg/mL de doxorrubicina). Todos os testes e controles foram feitos em seis replicatas, em três experimentos independentes.

f) Análise estatística e cálculo da IC50: Foi elaborada uma curva dose-resposta (absorbância x concentrações), com base nos tratamentos e no controle negativo. Os dados foram submetidos à análise de regressão linear, análise de variância (ANOVA) e pós-teste de Dunnet, assumindo $p < 0,05$. A curva dose-resposta foi obtida na forma de gráfico e a IC50 calculada através da equação da reta entre os pontos. Foram utilizadas as funções do Excel, Origin 6.0 Professional e Graph Pad Prism 5 (Graph-Pad Software Inc., San Diego, CA, USA).

4.6. Ensaios de atividade anti-*Leishmania* (Muelas-Serrano et al., 2000)

a) Substâncias avaliadas: Somente as substâncias com atividades significativas no ensaio citotóxico foram avaliadas quanto ao perfil anti-*Leishmania* (isatina e ácido gálico). As concentrações variaram entre 7,8 e 500 µg/mL.

b) Ensaios: Os ensaios de atividade anti-*Leishmania* foram realizados utilizando a técnica de MTT (sal de tetrazólio) modificada, de acordo com Muelas-Serrano (2000). Inicialmente, formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* foram cultivadas em meio LIT (Liver Infusion Tryptose) a 24 °C. A composição e o preparo do meio estão descritos no anexo IV desse trabalho. As formas promastigotas em fase logarítmica de crescimento foram contadas em câmara de Neubauer e, em seguida, foi preparada uma suspensão com 2 milhões de parasitas/mL. Foram adicionados 100 µL de suspensão por cavidade, em uma placa de 96 cavidades, a qual foi imediatamente incubada por 1 h a 24 °C. As diluições das substâncias foram adicionadas em cada cavidade, não ultrapassando a concentração máxima permitida de DMSO (3 % v/v). Cada concentração foi testada em triplicata, em 3 experimentos independentes. A viabilidade de promastigotas foi determinada através da

técnica colorimétrica de MTT (sal de tetrazólio), após 3 dias de incubação. O controle positivo consistiu em uma solução de pentamidina 5 µg/mL (capaz de reduzir a viabilidade dos parasitas em cerca de 50 %). Para confirmação dos resultados obtidos pelo método MTT, também foi realizada a “análise visual”, que consistiu na contagem dos parasitas em câmara de Neubauer, expressando a porcentagem de parasitas viáveis em relação ao total de parasitas contatos.

c) Análise dos dados: Foi elaborada uma curva dose-resposta com base nos tratamentos e no controle negativo. Os dados foram submetidos à análise de regressão linear, variância (ANOVA) e pós-teste de Dunnet, assumindo $p < 0,05$. A curva dose-resposta foi obtida na forma de gráfico e a IC50 calculada por meio da equação da reta entre os pontos. Foram utilizadas as funções do Excel, Origin 6.0 Professional e Graph Pad Prism 5 (Graph-Pad Software Inc., San Diego, CA, USA).

4.7. Ensaios de atividade anti-bacteriana

Diversos métodos laboratoriais podem ser empregados para prever a sensibilidade *in vitro* de bactérias aos agentes anti-bacterianos, sendo aplicados em estudos pilotos de novas substâncias ativas. O ensaio de difusão em Agar, primeiramente descrito por Kirby-Bauer (1966), é um método que permite realizar uma triagem da atividade anti-microbiana de extratos, substâncias e outros derivados de drogas vegetais. O método de diluição em tubos, primeiramente descrito por Jorgensen et al. (1999), é comumente utilizado na avaliação anti-microbiana de compostos químicos, entretanto, consomem consideráveis quantidades de substância teste. Dessa maneira, técnicas espectrofotométricas de microdiluição, utilizando um princípio similar, porém, desenvolvidas em placas de 96 cavidades, possibilitam a utilização de volumes reduzidos na determinação da concentração inibitória mínima de produtos químicos. Tais técnicas permitem a análise de vários

compostos e diferentes linhagens bacterianas simultaneamente, além de resultados mais sensíveis (ELOFF, 1998).

a) Substâncias avaliadas: As substâncias avaliadas foram amentoflavona, ácido gálico, ácido quínico, kaempferol-3,7-diraminosídeo, rutina, índigo, indirubina e isatina. Os métodos utilizados foram difusão em agar (NCLLS, 2003a) e microdiluição em placas de 96 cavidades (NCLLS, 2003). As concentrações das substâncias variaram entre 7,8 a 1000µg/mL para as duas metodologias.

b) Cepas bacterianas e meios de cultura: Com base nos relatos populares sobre a utilização das espécies selecionadas nesse trabalho para o tratamento de distúrbios gastrintestinais (SANNOMIYA et al., 2005; CARDOSO et al., 2006), foram selecionadas duas cepas bacterianas para realização dos ensaios de triagem da atividade anti-bacteriana: uma Gram positiva (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923) e outra Gram negativa (*Escherichia coli* ATCC 25922), geralmente associadas a infecções intestinais ou diarréias (CACERES et al., 1990; AZEVEDO et al., 2007).

A composição e o preparo dos meios de cultura utilizados estão no anexo III desse trabalho.

c) Ensaio de disco-difusão (NCCLS, 2003a): Três colônias foram selecionadas da placa de agar. A superfície de cada colônia foi tocada com agulha e os micro-organismos foram transferidos para um tubo contendo 4mL de caldo Mueller-Hinton (Difco) estéril. O caldo foi incubado a 35 °C (24 h). A turbidez foi ajustada com tampão fosfato pH 7,2 de modo a comparar-se com a escala padrão de McFarland 0,5 (1×10^8 UFC/mL). Para a inoculação em placa, empregou-se um swab estéril, o qual foi mergulhado na suspensão e apertado firmemente contra a parede do tubo (para retirar o excesso de inóculo). A semeadura foi realizada esfregando-se o swab de maneira homogênea na superfície do agar. Os discos de papel (Whatman nº1) foram impregnados com 20 µL das diluições das

substâncias. Após a absorção, cada disco foi pressionado de encontro à placa. Os discos foram distribuídos de maneira que a distância de centro para centro não excedesse 24mm. As placas foram invertidas e colocadas em geladeira (4 °C, 2 h) e, em seguida, incubadas em estufa a 35 °C. Como controle negativo, foi utilizado DMSO (5 %) diluído em caldo. Como controle positivo, foi utilizada uma solução de ciprofloxacina 35 µg/mL para as duas linhagens bacterianas. Após 24 h de incubação, as placas foram examinadas. Foi observada a presença de crescimento confluyente e halos de inibição uniformemente circulares. Os diâmetros dos halos de inibição do crescimento (analisados a olho nú) foram mensurados (mm). A média e desvio padrão dos halos de inibição das replicatas (mm) foram obtidos utilizando o programa Origin 6,0 Professional.

d) Ensaio de microdiluição - (NCCLS, 2003): Culturas de 24 h das duas linhagens de bactérias, cultivadas em caldo Mueller-Hinton (Difco), foram transferidas para solução tampão fosfato pH 7,2. A turbidez de cada suspensão foi ajustada até a escala 0,5 de McFarland (10^8 células/mL) e, em seguida, diluída na proporção 1:10 para atingir a concentração de 10^7 células/mL, a qual foi utilizada nos ensaios. As cavidades da placa foram preenchidas inicialmente com 80 µL de meio de cultura (caldo Mueller-Hinton estéril). Em seguida, 100 µL das diluições de cada substância foram devidamente aplicados nas microplacas e, ao final, 20 µL de suspensão bacteriana. Além dos testes, foram realizados os seguintes controles: a) negativo (meio de cultura e bactérias); b) controle de solvente (meio de cultura e DMSO a 5 %); c) controle de cor e esterilidade da amostra (para cada uma das diluições das substâncias). As placas foram incubadas por 24 h a 37°C e, após esse período, submetidas aos procedimentos de leitura.

Cada microplaca foi avaliada sob 3 parâmetros diferentes: a) leitura visual do crescimento bacteriano; b) leitura espectrofotométrica em 620nm; c) adição de uma solução de resazurina (5 µg/mL), utilizada como indicador de crescimento bacteriano. A CIM é

determinada através da relação direta entre a absorbância do crescimento bacteriano e concentração da substância testada. A CIM é definida, graficamente, como sendo a menor concentração da substância que induziu a um declínio no valor da absorbância, o qual foi mantido nas concentrações seguintes. A CBM foi determinada como a menor concentração da substância a partir da qual não foi verificado crescimento bacteriano após repique do microorganismo em meios isentos de substância teste. A média e o desvio padrão das replicatas foram obtidos utilizando o programa Origin 6,0 Professional. Os gráficos de crescimento bacteriano foram elaborados utilizando o programa Graph Pad Prism 5 (Graph-Pad Software Inc., San Diego, CA, USA).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

“Comece fazendo o que é necessário, depois, o que é possível. De repente, você estará fazendo o impossível”.

(São Francisco de Assis)

A História mostra que a utilização de fitoterápicos esteve presente em todas as civilizações e em todos os tempos, sempre trazendo grandes benefícios terapêuticos e descoberta de novos conhecimentos (ROSA LIMA, 2006). A Fitoterapia consiste em uma forma de terapia medicinal que vem crescendo muito nesses últimos anos, porém, gradativamente, destacando-se em países tecnologicamente desenvolvidos, que detêm um mercado extremamente lucrativo (YUNES et al., 2001).

Os estudos científicos com espécies vegetais têm se revelado uma importante atividade, não apenas acadêmica, mas também econômica e social (SANTOS, 2006). No Brasil, embora haja uma extensa diversidade natural e cultural, a maioria dos fitoterápicos fabricados atualmente pela indústria está fundamentada somente no uso popular das plantas, sem nenhuma comprovação pré-clínica e nem clínica (YUNES et al., 2001). Apesar do aumento das pesquisas na área, os dados disponíveis revelam que apenas 15 a 17% das plantas foram estudados quanto ao potencial medicinal (SOEJARTO, 1996). Grande parcela da população que utiliza plantas medicinais como recursos terapêuticos, muitas vezes únicos, parece desconhecer todas as vantagens ou, até mesmo, os riscos relacionados a essa prática (ELVIN-LEWIS, 2001). É certo que, embora os estudos etnofarmacológicos orientem a pesquisa de muitas substâncias de origem vegetal (YUNES & CALIXTO, 2001), é necessária uma avaliação científica dos riscos e benefícios da utilização de plantas medicinais, mesmo como remédios. As plantas, ricas em substâncias estruturalmente diversificadas, podem causar efeitos adversos (JIMÉNEZ et al., 2005). Devido à

necessidade da descoberta de novas drogas, os estudos sobre os efeitos adversos dos princípios ativos vegetais têm sido intensificados (EBLING et al., 2005; MEI et al., 2005; RIETJENS et al., 2005).

Após uma análise desse contexto, é importante ressaltar a necessidade de se utilizar a biodiversidade de maneira sustentada, sem prejudicar as reservas naturais da planta medicinal ou torná-la susceptível à extinção (ALLEMANN et al., 2002). No Brasil, a maioria dos biomas já se encontra em avançado estágio de devastação, promovendo o risco de se perderem muitas espécies vegetais, antes mesmo de serem química ou biologicamente estudadas (SANTOS, 2006). O cerrado brasileiro, por exemplo, constitui uma área detentora de rica e desconhecida biodiversidade, porém, estudos demonstram que 50% de seu potencial já foram destruídos (JEPSON, 2005) e que a destruição pode ser completa daqui a alguns anos, se o ritmo de desmatamentos, queimadas e invasões agrícolas permanecer como está atualmente (MACHADO et al, 2004). Considerando que muitos estudos científicos com plantas estão direcionados para a descoberta de moléculas farmacologicamente ativas, é extremamente importante que os estudos fitoquímicos sejam acompanhados de ensaios biológicos, *in vitro* e *in vivo*, favorecendo a descoberta de protótipos de novos fármacos e estabelecendo parâmetros que precederão as avaliações pré-clínicas e clínicas (YUNES & CALIXTO, 2001). Devido à complexidade da denominada “química natural”, certamente existem, ainda, muitas substâncias de origem vegetal a serem estudadas (CANNEL et al., 1998).

Com base nesse panorama geral, o presente trabalho foi fundamentado na avaliação de alguns riscos e benefícios da utilização de espécies vegetais conhecidas popularmente, pertencentes ao cerrado brasileiro, desde os extratos até as substâncias isoladas a partir dos mesmos. Esse direcionamento é muito importante, pois, considerando que a atividade dos fitoterápicos tem alvos metabólicos e químicos paralelos, é possível sugerir que a sinergia entre essas substâncias deve atuar também nas aplicações terapêuticas (YUNES et

al., 2001). Não parece adequado selecionar um dos compostos ativos, geralmente o mais abundante e desprezar a mistura que, muitas vezes, pode ser mais efetiva e apresentar efeitos diferentes daqueles observados com a substância isolada (BORRIS, 1997).

Em síntese, é imprescindível que os estudos com plantas medicinais sejam estimulados, não somente pelo esclarecimento à população que as utiliza, mas também porque se tem no Brasil uma riqueza de espécies ainda não estudada, a qual constitui uma promissora fonte de novas drogas (VARANDA, 2006).

Considerando o caráter multidisciplinar desse trabalho, com avaliação do potencial mutagênico das espécies vegetais (como um efeito adverso), da atividade fitoestrogênica, antitumoral e antiparasitária (como efeitos farmacológicos), os resultados e discussões foram subdivididos em itens, para facilitar a compreensão dos mesmos. Esse trabalho é integrante de um projeto temático (Projeto Biota – FAPESP), com o título “Uso sustentável da biodiversidade brasileira: prospecção químico-farmacológica em plantas superiores”, sob a coordenação do Prof^o Dr. Wagner Vilegas, do Departamento de Química Orgânica do Instituto de Química da UNESP de Araraquara. O projeto temático envolve laboratórios com várias linhas de pesquisa, que estão realizando ensaios para a avaliação de diferentes atividades biológicas para compostos vegetais, entre elas, atividade antiúlcera, antiinflamatória, anti-microbiana, entre outras. Os resultados obtidos pelo grupo, até o momento, direcionaram os temas, ensaios, plantas e substâncias selecionadas nesse trabalho, com o objetivo de complementar e contribuir com novas informações sobre as espécies mais promissoras. Os estudos fitoquímicos das espécies avaliadas nesse trabalho foram realizados no Laboratório de Fitoquímica do Departamento de Química Orgânica do Instituto de Química da UNESP de Araraquara, pelas doutoras Miriam Sannomiya, Tamara Regina Calvo e colaboradores, sob a orientação do Prof^o Dr. Wagner Vilegas.

5.1. Avaliação da atividade mutagênica

Os estudos de mutagenicidade e anti-mutagenicidade com plantas têm crescido juntamente com o aumento do uso terapêutico e com o interesse em comprovar a eficácia das mesmas nas mais diversas finalidades farmacológicas (JIMÉNEZ et al., 2005). As plantas constituem uma fonte inesgotável de substâncias químicas e muitas delas podem ser potencialmente mutagênicas e citotóxicas, ou, até mesmo, estarem relacionadas com o desenvolvimento de tumores (AMES, 1983). Espécies vegetais utilizadas popularmente têm sido avaliadas quanto ao potencial mutagênico em vários países e muitas delas têm promovido algum tipo de alteração no DNA (TAYLOR et al., 2003). Alguns estudos também têm sido realizados com espécies da flora brasileira, utilizadas popularmente para o tratamento de várias enfermidades. Segundo estudos realizados por Santos et al. (2006), o extrato metanólico de *Strychnos pseudoquina*, uma espécie do cerrado brasileiro, utilizada popularmente para o tratamento de úlceras gástricas, apresentou efeito mutagênico *in vivo* e *in vitro*. Varanda et al. (2002), verificaram que extratos de *Brosimum gaudichaudii*, utilizada para o tratamento de vitiligo, apresentaram efeitos mutagênicos através de teste de Ames e culturas de células CHO. Outra espécie vegetal, comum no nordeste brasileiro, chamada *Ocotea duckei* Vattimo, com várias aplicações terapêuticas populares, entre elas, antialérgico e antiplaquetário, também apresentou efeito mutagênico quando os extratos foram avaliados (MARQUES et al., 2003). LOPEZ et al. (2000) avaliaram o extrato etanólico de *Ocimum basilicum*, uma espécie utilizada sob a forma de infuso como anti-espasmódico e carminativo, verificando seu potencial mutagênico *in vitro*. A triagem do efeito mutagênico *in vitro* dos extratos de várias espécies vegetais ricas em flavonóides, taninos e antraquinonas, também foram realizados por FERREIRA & VARGAS (1999), que verificaram um potencial mutagênico significativo. Entre elas, destacam-se *Myrciaria tenella* (Myrtaceae), *Smylax campestris* Griseb (Smilacaceae), *Cassia corymbosa* Benth (Leguminosae), entre outras.

Com base nesses estudos, podemos afirmar que os ensaios para a avaliação da atividade mutagênica das plantas utilizadas pela população, assim como suas substâncias isoladas, são necessários e importantes para estabelecer medidas de controle do uso indiscriminado. Além disso, é preciso esclarecer os mecanismos e as condições que promovem o efeito biológico, antes que as plantas sejam consideradas como agentes terapêuticos (VARANDA, 2006). Esse esclarecimento pode impedir que as plantas, quando preparadas, possam tornar-se perigosas para a saúde (SANTOS, 2006).

Para a avaliação da atividade mutagênica, existem vários ensaios, contudo, destacam-se os estudos que utilizam o princípio de mutação gênica reversa com *Salmonella typhimurium* (*Salmonella*/microsome assay). Portanto, selecionamos o teste de Ames para a realização da avaliação da mutagenicidade *in vitro*, pois é uma metodologia de alta reprodutibilidade para detectar substâncias mutagênicas (MORTELMANS & ZEIGER, 2000; RIBEIRO et al., 2004), além de ser reconhecido mundialmente por sua eficiência na detecção de mutações pontuais por diferentes agentes (SANTOS, 2006). Utilizamos as linhagens TA98, TA97a, TA100 e TA102, capazes de promover uma triagem abrangente de diferentes compostos mutagênicos primários ou secundários, com vários mecanismos de ação (CHUNG et al., 2005).

No contexto do projeto Biota-FAPESP, *B. fagifolia* foi uma planta que se mostrou promissora pois, além do seu potencial no tratamento de úlceras, possui derivados do ácido galoilquínico, cujas estruturas são indicadas para o tratamento de algumas infecções, entre elas, pelo vírus HIV. Por esse motivo, foi considerada no presente trabalho como uma espécie significativa do gênero *Byrsonima*. Foram realizados os ensaios de mutagenicidade *in vitro*, através do Teste de Ames, com o extrato metanólico (polar), clorofórmico (apolar), além das frações obtidas a partir do extrato polar de *B. fagifolia*. A triagem da toxicidade dos extratos foi realizada com concentrações decrescentes de cada um deles, para todas as linhagens, pois cada uma apresenta diferente sensibilidade. A maior concentração não

tóxica para todas as linhagens foi o parâmetro de escolha das demais concentrações menores, já que nos ensaios de mutagenicidade, é importante avaliar a menor concentração possível de uma substância capaz de causar alterações genéticas (VIANA et al., 2005). O DMSO foi adicionado aos controles negativos de todos os experimentos, já que todos os extratos, frações e substâncias isoladas foram dissolvidos nesse solvente, sendo importante avaliar se o mesmo não estaria interferindo na promoção da mutação reversa, favorecendo “falsos positivos”.

Os resultados obtidos com os extratos metanólico e clorofórmico de *B. fagifolia* (tabela 1) não evidenciaram efeitos mutagênicos em todas as linhagens utilizadas para os ensaios (TA98, TA97a, TA100 e TA102). As concentrações testadas variaram entre 0,81 e 6,44 mg/placa (extrato metanólico) e 0,78 a 6,25 mg/placa (extrato clorofórmico). Os índices mutagênicos variaram entre 0,9 e 1,3.

As frações aquosa e acetato de etila, obtidas do extrato metanólico, também não apresentaram efeitos mutagênicos (para todas as linhagens) nas concentrações testadas, que variaram entre 0,21 e 2,66 mg/placa (aquosa) e 0,29 a 2,34 mg/placa (acetato). Os resultados obtidos constam na tabela 2.

Tabela 1: Mutagenicidade expressa pela média \pm desvio padrão do número de revertentes/placa em linhagens de *S typhimurium* (TA98, TA97a, TA100 e TA 102) expostas aos extratos de *B. fagifolia* em várias concentrações, sem (-S9) e com (+S9) ativação metabólica.

Tratamento (mg/pl) (MeOH)	TA98 (-S9)	TA98 (+S9)	TA100 (-S9)	TA100 (+S9)	TA97a (-S9)	TA97a (+S9)	TA102 (-S9)	TA102 (+S9)
0	23 \pm 1,0	30 \pm 3,1	142 \pm 1,5	143 \pm 6,0	148 \pm 1,0	150 \pm 7,1	290 \pm 1,7	305 \pm 7,0
0,81	22 \pm 0,6 (0,9)	33 \pm 4,5 (1,1)	113 \pm 1,0 (0,8)	133 \pm 4,5 (0,9)	148 \pm 0,6 (1,0)	147 \pm 7,5 (0,9)	278 \pm 1,5 (0,9)	293 \pm 6,6 (0,9)
1,21	23 \pm 1,0 (1,0)	33 \pm 10,8 (1,1)	102 \pm 2,0 (0,7)	134 \pm 7,5 (0,9)	149 \pm 1,0 (1,0)	150 \pm 7,4 (1,0)	273 \pm 3,1 (0,9)	303 \pm 22,3 (0,9)
1,61	26 \pm 1,0 (1,1)	31 \pm 2,1 (1,0)	95 \pm 3,0 (0,7)	139 \pm 6,0 (0,9)	151 \pm 1,0 (1,0)	154 \pm 4,4 (1,0)	279 \pm 9,5 (0,9)	307 \pm 19,9 (1,0)
3,22	28 \pm 1,0 (1,2)	32 \pm 1,5 (1,1)	99 \pm 1,0 (0,7)	135 \pm 10,8 (0,9)	153 \pm 0,6 (1,0)	154 \pm 7,6 (1,0)	284 \pm 1,5 (1,0)	316 \pm 17,5 (1,0)
6,44	29 \pm 1,0 (1,3)	35 \pm 11,5 (1,2)	97 \pm 2,7 (0,7)	139 \pm 6,0 (0,9)	154 \pm 1,0 (1,0)	147 \pm 9,6 (0,9)	277 \pm 2,5 (0,9)	320 \pm 31,5 (1,0)
(CLO)								
0	23 \pm 1,0	30 \pm 3,1	142 \pm 1,5	143 \pm 6,0	148 \pm 1,0	150 \pm 7,1	290 \pm 1,7	305 \pm 7,0
0,78	21 \pm 1,0 (0,9)	27 \pm 3,1 (0,9)	147 \pm 11,2 (1,0)	137 \pm 9,3 (0,9)	148 \pm 0,6 (1,0)	141 \pm 8,0 (0,9)	282 \pm 4,0 (1,0)	283 \pm 10,5 (0,9)
1,56	24 \pm 1,0 (1,1)	24 \pm 2,5 (0,8)	135 \pm 9,5 (0,9)	139 \pm 6,0 (0,9)	148 \pm 1,0 (1,0)	143 \pm 14,0 (0,9)	271 \pm 4,0 (0,9)	298 \pm 5,0 (0,9)
3,13	25 \pm 1,0 (1,1)	25 \pm 3,5 (0,8)	136 \pm 1,5 (0,9)	150 \pm 6,7 (1,0)	152 \pm 1,7 (1,0)	141 \pm 12,3 (0,9)	280 \pm 4,5 (1,0)	289 \pm 13,3 (0,9)
4,69	25 \pm 1,0 (1,1)	28 \pm 5,1 (0,9)	140 \pm 10,4 (1,0)	148 \pm 8,6 (1,0)	151 \pm 4,5 (1,0)	149 \pm 11,2 (0,9)	272 \pm 6,1 (0,9)	303 \pm 9,3 (0,9)
6,25	25 \pm 1,0 (1,1)	29 \pm 4,0 (0,9)	142 \pm 3,5 (1,0)	143 \pm 14,0 (1,0)	152 \pm 1,7 (1,0)	150 \pm 11,6 (1,0)	267 \pm 0,6 (0,8)	291 \pm 14,9 (0,9)
C. positivo	498 \pm 13,9 (a)	472 \pm 25,8 (b)	757 \pm 28,3 (c)	749 \pm 74,7 (b)	700 \pm 23,0 (a)	807 \pm 19,4 (b)	1044 \pm 66,1 (d)	1048 \pm 81,4 (b)

MeOH = extrato metanólico; CLO = extrato clorofórmico; 0 = controle negativo (DMSO – 100 μ L/placa); controles positivos: ^a NPD (4-nitrofenilenediamina 10 μ g/placa); ^b 2-antramine (1,25 μ g/placa); ^c azida sódica (1,25 μ g/placa); ^d mitomicina (0,5 μ g/placa). Os valores entre *parentesis* correspondem ao índice de mutagenicidade.

Tabela 2: Mutagenicidade expressa pela média \pm desvio padrão do número de revertentes/placa em linhagens de *S typhimurium* (TA98, TA97a, TA100 e TA 102) expostas às frações do extrato metanólico de *B. fagifolia* em várias concentrações, sem (-S9) e com (+S9) ativação metabólica.

Tratamento (mg/pl)	TA98 (-S9)	TA98 (+S9)	TA100 (-S9)	TA100 (+S9)	TA97a (-S9)	TA97a (+S9)	TA102 (-S9)	TA102 (+S9)
(FAq)								
0	23 \pm 1,0	30 \pm 3,1	142 \pm 1,5	143 \pm 6,0	148 \pm 1,0	150 \pm 7,1	290 \pm 1,7	305 \pm 7,0
0,21	22 \pm 1,0 (1,0)	28 \pm 6,0 (0,9)	133 \pm 1,2 (0,9)	136 \pm 7,9 (0,9)	148 \pm 0,6 (1,0)	145 \pm 5,3 (0,9)	275 \pm 3,1 (0,9)	294 \pm 10,4 (0,9)
0,42	23 \pm 0,6 (1,1)	30 \pm 4,2 (1,0)	-	-	148 \pm 0,6 (1,0)	151 \pm 7,6 (1,0)	-	-
0,83	25 \pm 1,0 (1,1)	29 \pm 3,2 (0,9)	151 \pm 11,6 (1,0)	139 \pm 4,5 (0,9)	152 \pm 0,6 (1,0)	148 \pm 4,0 (0,9)	284 \pm 6,8 (1,0)	297 \pm 11,8 (0,9)
1,25	26 \pm 1,5 (1,2)	30 \pm 4,0 (1,0)	147 \pm 5,9 (1,0)	149 \pm 3,1 (1,0)	156 \pm 0,6 (1,1)	148 \pm 6,0 (0,9)	287 \pm 0,6 (1,0)	306 \pm 6,0 (1,0)
2,66	27 \pm 0,0 (1,2)	30 \pm 4,1 (1,0)	144 \pm 5,2 (1,0)	140 \pm 4,0 (0,9)	157 \pm 1,6 (1,1)	143 \pm 4,4 (0,9)	283 \pm 6,1 (1,0)	311 \pm 11,6 (1,0)
(Fac)								
0	23 \pm 1,0	30 \pm 3,1	142 \pm 1,5	143 \pm 6,0	148 \pm 1,0	150 \pm 7,1	290 \pm 1,7	305 \pm 7,0
0,29	24 \pm 1,0 (1,1)	34 \pm 5,7 (1,1)	144 \pm 0,6 (1,0)	142 \pm 7,6 (0,9)	193 \pm 4,2 (1,0)	160 \pm 5,3 (1,1)	-	-
0,58	25 \pm 0,6 (1,1)	41 \pm 7,6 (1,4)	144 \pm 5,2 (1,0)	149 \pm 4,0 (1,0)	197 \pm 2,3 (1,0)	169 \pm 4,2 (1,1)	277 \pm 9,1 (1,0)	303 \pm 6,0 (0,9)
1,17	26 \pm 1,0 (1,2)	42 \pm 10,5 (1,4)	152 \pm 3,5 (1,1)	145 \pm 8,3 (1,0)	198 \pm 0,6 (1,0)	178 \pm 5,1 (1,2)	276 \pm 0,6 (1,0)	323 \pm 9,5 (1,1)
1,75	27 \pm 0,6 (1,2)	44 \pm 2,5 (1,5)	151 \pm 5,0 (1,1)	153 \pm 5,6 (1,1)	199 \pm 0,6 (1,1)	179 \pm 4,2 (1,2)	285 \pm 0,6 (1,0)	311 \pm 15,1 (1,0)
2,34	29 \pm 1,0 (1,3)	43 \pm 3,1 (1,4)	153 \pm 4,1 (1,1)	151 \pm 2,5 (1,1)	200 \pm 2,1 (1,1)	179 \pm 6,4 (1,2)	281 \pm 1,7 (1,0)	321 \pm 9,9 (1,1)
C. positivo	498 \pm 13,9 (a)	472 \pm 25,8 (b)	757 \pm 28,3 (c)	749 \pm 74,7 (b)	700 \pm 23,0 (a)	807 \pm 19,4 (b)	1044 \pm 66,1 (d)	1048 \pm 81,4 (b)

FAq = (fração aquosa); Fac (fração acetato); 0 = controle negativo (DMSO – 100 μ L/placa); controles positivos: ^a NPD (4-nitrofenilenodiamina 10 μ g/placa); ^b 2-antramine (1,25 μ g/placa); ^c azida sódica (1,25 μ g/placa); ^d mitomicina (0,5 μ g/placa). Os valores entre *parentesis* correspondem ao índice de mutagenicidade.

Algumas substâncias isoladas desse extrato também foram testadas, sendo elas: galato de metila, ácido gálico, ácido quínico e o derivado 3,4-digaloilquínico. Os ensaios foram realizados com TA98, a qual foi selecionada para ensaios com substâncias isoladas. As substâncias majoritárias, ácido gálico e galato de metila, não apresentaram efeito mutagênico nas concentrações testadas, que variaram de 0,08 a 1,20 mg/placa. Na maior concentração, o galato de metila apresentou o índice de mutagenicidade 1,6, com significância estatística em nível de $p < 0,01$, o que caracteriza o chamado “índice de mutagenicidade”. O ácido gálico apresentou um perfil similar, com índice de mutagenicidade de 1,8 na maior concentração testada (sem metabolização).

O ácido quínico e o derivado galoilquínico foram testados com TA98, em concentrações que variaram entre 0,25 e 1,0 mg/placa. A atividade mutagênica foi negativa, exceto para a maior concentração de ácido quínico (1,0 mg/placa), na qual foi observado o índice de mutagenicidade (IM = 1,7). A tabela 3 demonstra os resultados obtidos para as substâncias isoladas do extrato metanólico de *B. fagifolia* utilizando a linhagem TA98.

Tabela 3: Atividade mutagênica expressa pela média \pm desvio padrão do número de revertentes por placa (linhagem TA98) exposta às substâncias isoladas do extrato metanólico de *B. fagifolia* em várias concentrações, sem (-S9) e com (+S9) ativação metabólica.

Tratamento (mg/pl)	TA98 (-S9)		TA98 (+S9)		TA98 (-S9)		TA98 (+S9)		TA98 (-S9)		TA98 (+S9)	
	Ácido gálico		Galato de metila		Acido quinico		3,4-digalolilquinico					
0	37 \pm 5,6	28 \pm 0,7	37 \pm 5,6	28 \pm 0,7	29 \pm 3,5	21 \pm 3,7	29 \pm 3,5	21 \pm 3,7				
0,08	44 \pm 2,1 (1,2)	31 \pm 1,2 (1,0)	49 \pm 8,5 (1,3)	25 \pm 1,4 (0,9)								
0,25	48 \pm 1,7 (1,3)	33 \pm 2,5 (1,2)	47 \pm 8,9 (1,3)	31 \pm 0,7 (1,1)	31 \pm 1,0 (1,1)	29 \pm 3,1 (1,4)	30 \pm 2,0 (1,0)	23 \pm 3,5 (1,0)				
0,4	52 \pm 2,0 (1,4)	35 \pm 1,0 (1,3)										
0,42			54 \pm 4,0* (1,5)	34 \pm 1,6 (1,2)								
0,5					31 \pm 2,7 (1,1)	29 \pm 4,6 (1,4)	31 \pm 2,3 (1,1)	24 \pm 4,0 (1,1)				
0,75					32 \pm 1,5 (1,1)	28 \pm 3,6 (1,4)	31 \pm 4,0 (1,1)	28 \pm 2,1 (1,3)				
0,80	61 \pm 4,2* (1,6)	38 \pm 2,0 (1,4)			48 \pm 3,1** (1,7)	30 \pm 4,0 (1,4)	31 \pm 4,6 (1,1)	31 \pm 1,7* (1,5)				
1,00												
1,06	67 \pm 3,1* (1,8)	42 \pm 2,0** (1,5)	59 \pm 3,0* (1,6)	35 \pm 2,0 (1,2)								
C. positivo	1023 \pm 41,3 (a)	1152 \pm 70,0 (b)	1023 \pm 41,3 (a)	1152 \pm 70,0 (b)	1056 \pm 56,1 (a)	1047 \pm 74 (b)	1056 \pm 56,1 (a)	1047 \pm 74 (b)				

0 = controle negativo (DMSO – 100 μ L/placa); c. positivos: ^a NPD (4-nitrofenilenodiamina 10 μ g/placa); ^b 2-antramina (1,25 μ g/placa); Os valores entre *parentesis* correspondem ao índice de mutagenicidade.

Outros estudos revelaram que o ácido gálico e o galato de metila, substâncias presentes em *B. fagifolia*, não são mutagênicos em baixas concentrações. Ao contrário, são antioxidantes e, portanto, podem ser candidatos à atividade antimutagênica, dependendo do contexto biológico e da concentração considerada (BREINHOLT, 1999; CHEN & CHUNG, 2000; MARTÍNEZ et al., 2000; PEREIRA et al., 2005; BORA et al., 2005; ASOLINI et al., 2006; CARDEÑO et al., 2007; ALVES et al., 2007). Quanto aos derivados do ácido galoilquínico, existem poucos relatos na literatura sobre a relação entre estrutura química e atividades biológicas. O que se sabe é que essas substâncias já foram isoladas das folhas de *Guiera senegalensis* e das cascas de *Quercus stenophylla* e *Pystacia lentiscos*, plantas utilizadas como antitussígenos, antidepressivos, entre outras finalidades (DU PENHOAT et al., 1998; FERREIRA & VARGAS, 1999; AMOS et al., 2001). Existe também a hipótese relacionada ao potencial anti-HIV, embora não seja comprovada cientificamente. Esses estudos, sem dúvidas, são extremamente importantes para a elucidação dos riscos e benefícios da utilização dessas substâncias como candidatos a novos fármacos ou em preparações de utilização popular, como infusões. Segundo estudos de Sticha et al. (1981), o ácido quínico apresentou efeito mutagênico no teste de Ames, porém em concentrações maiores do que aquelas avaliadas nesse trabalho (dose-dependente).

Os resultados obtidos indicaram a ausência do efeito mutagênico no extrato metanólico de *B. fagifolia* e, comparando com o mesmo extrato *B. crassa* (mutagenicidade positiva), podemos sugerir que essa diferença ocorra justamente pela composição química diferenciada das duas espécies. Segundo estudos previamente realizados com *B. crassa*, verificamos que os derivados glicosilados da quercetina, predominantes nessa espécie, não apresentaram efeito mutagênico, porém a amentoflavona foi indicada como uma possível responsável pelo efeito observado, a qual está ausente em *B. fagifolia* (CARDOSO et al., 2006; SANTOS, 2006).

Um breve histórico dos resultados obtidos com *B. crassa* será relatado (Cardoso et al., 2006) evidenciando sua importância no contexto do presente trabalho. O extrato metanólico apresentou atividade mutagênica nos ensaios com a linhagem TA98 sem ativação metabólica. Após a metabolização, a dose-resposta ainda foi significativa em algumas concentrações, porém os valores de RM foram menores ou próximos a dois. Com a linhagem TA100, também houve dose-resposta significativa em ausência de metabolização, porém, com valores de RM menores que dois. Não foram observados resultados positivos nas demais linhagens testadas, com ou sem ativação metabólica. Como somente o extrato metanólico induziu mutagenicidade, procedeu-se a avaliação das frações aquosa e acetato de etila, obtidas a partir desse extrato. Não foram observados resultados positivos quanto à atividade mutagênica, porém, a fração acetato apresentou valores de RM de até 1,7 e efeito dose-resposta significativo em todas as concentrações, sugerindo que compostos responsáveis pela mutagenicidade estavam presentes nessa fração. Quanto às substâncias puras avaliadas (quercetina- α -L-arabinopiranosídeo, quercetina- β -D-galactopiranosídeo e amentoflavona), somente a amentoflavona apresentou atividade mutagênica considerável, em duas concentrações testadas, com sinais de toxicidade na concentração 1,12 mg/placa. Após a metabolização, permaneceu a atividade mutagênica, com pequena redução no número de colônias revertentes nas mesmas concentrações testadas sem S9.

Estudos fitoquímicos realizados com o extrato metanólico de *B. crassa* revelaram a presença, predominantemente, de derivados glicosilados da quercetina, amentoflavona, ácido gálico e galato de metila (substâncias comuns ao gênero), além de pequenas quantidades de catequina e taninos (SANNOMIYA et al., 2004).

Uma importante discussão levantada nesse trabalho (CARDOSO et al., 2006), foi sobre o potencial mutagênico da quercetina (aglicona) e de seus derivados glicosilados. Existem muitos estudos direcionados à elucidação do potencial mutagênico de flavonóides e da quercetina (RUEFF et al., 1992; FERREIRA & VARGAS, 1999), uma vez que é uma das

moléculas mais freqüentemente encontradas nos alimentos, principalmente em frutas. Devido às divergências dos estudos de carcinogenicidade da quercetina realizados *in vivo*, é importante salientar que essa molécula apresentou significativo potencial mutagênico em ensaios *in vitro*, principalmente pelo teste de Ames (OKAMOTO, 2005). É possível que essa molécula promova mutações por mecanismos diferentes, como *frameshift*, substituição de bases (MACGRAGOR, 1983), formação de espécies reativas de oxigênio (GASPAR et al., 1993), entre outros. Também já foi relatado o efeito mutagênico *in vivo*, embora menos acentuado (SILVA et al., 2002). A avaliação do potencial mutagênico da quercetina foi decisiva para a compreensão dos resultados obtidos com seus derivados glicosilados, os quais apresentaram efeitos mutagênicos notavelmente reduzidos. Segundo uma revisão da literatura, realizada por HEIN et al. (2002), a estrutura molecular do flavonóide está diretamente relacionada com sua atividade biológica. Existem alguns fatores importantes que interferem na reatividade de um flavonóide, como número de hidroxilas, dupla ligação entre os carbonos 2 e 3 do anel C, estar sob a forma de aglicona, não apresentar polimerizações, entre outros. Ainda referenciando sobre esse assunto, RIETJENS et al. (2005), ressaltaram que a molécula de quercetina possui sítios estratégicos, entre eles, a hidroxila presente no carbono 3 do anel C. A adição de um radical a esse sítio (ex: luteonina) anulou o efeito mutagênico da quercetina. Analisando as estruturas dos derivados glicosilados da espécie, verificamos que a glicosilação ocorreu justamente nesse sítio, o que provavelmente promoveu a redução do potencial mutagênico dessas moléculas.

Esses resultados foram muito importantes, pois direcionaram a continuidade dos estudos com o extrato metanólico de *B. crassa*, além do enfoque no biflavonóide amentoflavona, provavelmente relacionado ao efeito mutagênico observado e que se apresentou, no contexto do projeto Biota, como uma molécula promissora quanto às atividades biológicas (seu potencial mutagênico é reduzido após a metabolização). Além disso, nos permitiram sugerir que a ausência de amentoflavona no extrato metanólico de *B.*

fagifolia caracterizou sua mutagenicidade negativa, já que os derivados glicosilados da quercetina, em geral, não são mutagênicos.

Alguns estudos recentes têm demonstrado diversas atividades biológicas da amentoflavona, reforçando nosso objetivo de avaliar outras atividades biológicas dessa substância. Segundo estudos de Woo et al. (2008), a amentoflavona apresentou atividade moduladora da expressão de matrix metatoproteinase tipo I (MMP -1) em fibroblastos humanos. Existe considerável evidência de que a família das metaloproteinases da matriz desempenhe um papel importante no equilíbrio da matriz extracelular, promovendo a reabsorção fisiológica do colágeno e outras macromoléculas durante a remodelação pós-natal e, também, na reabsorção patológica associada, por exemplo, à invasividade de tumores malignos, à destruição de articulações e até na resposta imunológica destrutiva do tecido conjuntivo (FIGUEREDO et al., 2003). Outras atividades biológicas também foram avaliadas, entre elas, o potencial anti-helmíntico *in vitro* (SINGH et al., 2008), inibição do herpes vírus humano tipo I (HSV – 1) isolado de lesões da cavidade oral (POSER et al., 2007), atividade inibidora da DNA topoisomerase humana tipo I além de potente atividade antitumoral (CARVALHO et al., 2007; CASTANHO et al., 2007). Outros estudos, ainda, revelaram uma possível relação entre a amentoflavona e a atividade antidepressiva observada na utilização de algumas plantas medicinais com essa finalidade terapêutica. Essa ação estaria relacionada à capacidade moduladora negativa da amentoflavona e outros biflavonóides sobre os receptores GABA A (RIBEIRO, 2000; HANRAHAN, 2003). Na literatura também contam estudos que evidenciam a atividade inibitória da amentoflavona na biossíntese de PGE₂, COX-2 mRNA e a expressão de proteínas relacionadas (BANERJEE et al., 2002; O'LEARY et al., 2004). Estudos ainda relacionados aos processos inflamatórios evidenciaram que a amentoflavona e outros biflavonóides relacionados também podem inibir a biossíntese de FLA₂, pertencente a uma família de funções celulares diversas (CHEN et al., 2006). Ainda quanto à inibição enzimática, também se destacam na literatura os estudos

de Pan et al. (2005), que comprovaram a atividade da amentoflavona sobre a catepsina B, uma cisteína-proteinase que tem sido relacionada com muitas patologias, como artrite e câncer. Segundo estudos de Kang et al. (2005), esse biflavonóide também apresentou interessante atividade neuroprotetora contra agressões celulares promovidas por estresse oxidativo, sugerindo um potencial agente terapêutico para doenças neurodegenerativas.

Apesar de todas as evidências sobre o seu potencial farmacológico, é importante ressaltar que, dependendo da concentração, a amentoflavona apresentou atividade mutagênica *in vitro*, podendo causar danos ao DNA (UDDIN et al., 2004; CARDOSO et al., 2006). Portanto, devido ao seu potencial farmacológico e também adverso (de acordo com a concentração), ressaltamos a importância dos estudos realizados nesse trabalho, com o objetivo de levantar mais informações científicas a respeito dessa substância.

Também foram realizados os ensaios de mutagenicidade *in vitro*, através do Teste de Ames, com espécies vegetais do gênero ***Indigofera***. Os ensaios com *I. truxillensis* foram bastante detalhados, pois estavam disponíveis massas consideráveis de extratos, frações e algumas substâncias isoladas a partir do extrato metanólico. As espécies pertencentes ao gênero *Indigofera* se destacam por possuírem alcalóides majoritários (indirubina e índigo). Essa espécie, porém, se destaca pela grande quantidade de flavonóides glicosilados derivados do kaempferol.

Os ensaios de mutagenicidade incluíram uma triagem de dois extratos obtidos das folhas de *I. truxillensis*: um polar (extrato metanólico) e outro apolar (extrato clorofórmico). Foram utilizadas as linhagens TA98, TA97a, TA100 e TA102 (tabela 4). As concentrações testadas variaram entre 1,25 e 7,50 mg/placa. O extrato metanólico apresentou efeito mutagênico na concentração 3,75 mg/placa e, com o aumento da concentração, passou a demonstrar sinais de toxicidade. Com ativação metabólica (S9), esse extrato não apresentou efeito mutagênico nas mesmas concentrações. Nas demais linhagens o extrato não foi mutagênico. O extrato clorofórmico também não apresentou efeito mutagênico em todas as

linhagens, com e sem ativação metabólica (S9). Frente ao resultado obtido com extrato metanólico de *I. truxillensis*, direcionamos os ensaios com frações enriquecidas: com alcalóides (FA), com flavonóides (FF) e uma terceira, rica em glicerolipídeos (FG). As concentrações testadas variaram de 0,12 a 1,50 mg/placa (FA) e de 0,12 a 2,50 mg/placa para as frações FF e FG. Os resultados não demonstraram efeito mutagênico efetivo nas concentrações testadas (tabela 5). Na linhagem TA98, FA (1,50 mg/placa), induziu de maneira significativa o número de revertentes, com índice de mutagenicidade 1,7 e significância estatística em nível $p < 0,01$. A FF passou a apresentar indícios de mutagenicidade a partir da concentração 1,50 mg/placa, com índice de mutagenicidade 1,7 e significância estatística em nível $p < 0,01$, o que podemos considerar um indício de mutagenicidade. A FG não apresentou efeito mutagênico em todas as concentrações e linhagens testadas. Após a ativação metabólica, as frações não apresentaram efeito mutagênico, com exceção da fração enriquecida de flavonóides, na qual permaneceram indícios de mutagenicidade (índice de mutagenicidade 1,6 e significância estatística em nível $p < 0,05$).

Tabela 4: Mutagenicidade expressa pela média \pm desvio padrão do número de revertentes/placa em linhagens de *S. typhimurium* (TA98, TA97a, TA100 e TA 102) expostas aos extratos de *I. truxillensis* em várias concentrações, sem (-S9) e com (+S9) ativação metabólica.

Tratamento (mg/placa)	TA98 (-S9)	TA98 (+S9)	TA97a (-S9)	TA97a (+S9)	TA100 (-S9)	TA100 (+S9)	TA102 (-S9)	TA102 (+S9)
MeOH								
0	43 \pm 2,7	36 \pm 2,0	131 \pm 1,5	139 \pm 2,5	163 \pm 4,2	145 \pm 9,5	242 \pm 9,2	223 \pm 11,9
1,25	55 \pm 4,6 (1,3)	41 \pm 2,3 (1,1)	143 \pm 5,0 (1,1)	131 \pm 2,5 (0,9)	184 \pm 8,7 (1,1)	151 \pm 14,5 (1,0)	271 \pm 4,0 (1,1)	219 \pm 7,9 (0,9)
2,5	57 \pm 1,5 (1,3)	38 \pm 7,6 (1,1)	143 \pm 3,1 (1,1)	129 \pm 10,7 (0,9)	186 \pm 7,6 (1,1)	145 \pm 3,0 (1,0)	254 \pm 1,5 (1,0)	223 \pm 11,0 (1,0)
3,75	87 \pm 2,0**(2,0)	42 \pm 2,0 (1,3)	147 \pm 2,1(1,1)	137 \pm 6,8 (0,9)	194 \pm 4,0 (1,2)	149 \pm 11,9 (1,0)	258 \pm 1,0 (1,1)	238 \pm 6,7 (1,1)
5	77 \pm 6,1**(1,8)	45 \pm 4,2 (1,3)	148 \pm 5,0 (1,1)	142 \pm 16,1 (1,0)	180 \pm 6,2 (1,1)	141 \pm 7,6 (0,9)	264 \pm 4,0 (1,1)	228 \pm 5,3 (1,0)
7,5	75 \pm 5,0**(1,7)	51 \pm 3,1 (1,4)	159 \pm 7,8 (1,2)	134 \pm 16,0 (0,9)	173 \pm 5,0 (1,1)	140 \pm 5,5 (0,9)	280 \pm 35,6 (1,2)	249 \pm 11,0 (1,1)
CLO								
0	43 \pm 2,7	36 \pm 2,0	131 \pm 1,5	139 \pm 2,5	163 \pm 4,2	145 \pm 9,5	242 \pm 9,2	223 \pm 11,9
1,25	51 \pm 4,2 (1,2)	33 \pm 4,1 (0,9)	139 \pm 14,2 (1,1)	141 \pm 5,9 (1,0)	168 \pm 5,1 (1,1)	142 \pm 3,2 (0,9)	227 \pm 9,9 (0,9)	213 \pm 5,7 (0,9)
2,5	52 \pm 4,7 (1,2)	40 \pm 3,6 (1,1)	145 \pm 10,4 (1,1)	139 \pm 5,5 (1,0)	148 \pm 6,0 (1,2)	135 \pm 4,2 (0,9)	229 \pm 9,8 (0,9)	217 \pm 23,1 (0,9)
3,75	45 \pm 3,0 (1,1)	39 \pm 1,5 (1,1)	128 \pm 6,6 (0,9)	138 \pm 3,5 (1,0)	164 \pm 4,5 (1,2)	143 \pm 5,7 (0,9)	227 \pm 8,1 (0,9)	219 \pm 11,4 (0,9)
5	53 \pm 3,1 (1,1)	32 \pm 1,5 (0,9)	127 \pm 4,9 (0,9)	129 \pm 4,6 (0,9)	162 \pm 3,5 (1,0)	133 \pm 2,5 (0,9)	232 \pm 11,3 (0,9)	226 \pm 9,5 (1,0)
7,5	58 \pm 2,5 (1,3)	32 \pm 2,0 (0,9)	121 \pm 5,3 (0,9)	125 \pm 3,5 (0,9)	169 \pm 4,2 (1,3)	132 \pm 3,1 (0,9)	213 \pm 13,4 (0,9)	206 \pm 9,8 (0,9)
C, positivo	608 \pm 71,52 (a)	663 \pm 35,4 (b)	711 \pm 12,1 (a)	761 \pm 28,0 (b)	914 \pm 17,6 (c)	886 \pm 49,3 (b)	1076 \pm 57,1 (d)	1082 \pm 72,9 (b)

MeOH = extrato metanólico; CLO = extrato clorofórmico; 0 = controle negativo (DMSO – 100 μ L/placa); controles positivos: ^a NPD (4-nitrofenilenodiamina 10 μ g/placa); ^b 2-antramine (1,25 μ g/placa); ^c azida sódica (1,25 μ g/placa); ^d mitomicina (0,5 μ g/placa). Os valores entre *parentesis* correspondem ao índice de mutagenicidade.

Tabela 5: Mutagenicidade expressa pela média \pm desvio padrão do número de revertentes/placa em linhagens de *S. typhimurium* (TA98, TA97a, TA100 e TA 102) expostas às frações do extrato metanólico de *I. truxillensis* em várias concentrações, sem (-S9) e com (+S9) ativação metabólica.

Tratamento (mg/placa)	TA98 (-S9)	TA98 (+S9)	TA97a (-S9)	TA97a (+S9)	TA100 (-S9)	TA100 (+S9)	TA102 (-S9)	TA102 (+S9)
FA								
0	43 \pm 2,7	36 \pm 2,0	131 \pm 1,5	139 \pm 2,5	163 \pm 4,2	145 \pm 9,5	242 \pm 9,2	223 \pm 11,9
0,12	37 \pm 4,0 (0,9)	33 \pm 5,0 (0,9)	133 \pm 4,5 (1,0)	126 \pm 6,6 (0,9)	165 \pm 3,6 (1,0)	132 \pm 3,1 (0,9)	241 \pm 7,1 (0,9)	220 \pm 4,5 (0,9)
0,38	43 \pm 2,5 (1,0)	36 \pm 6,0 (1,0)	146 \pm 7,0 (1,1)	136 \pm 9,1 (0,9)	178 \pm 3,1 (1,1)	142 \pm 2,0 (0,9)	256 \pm 21,6 (1,1)	224 \pm 9,9 (1,0)
0,75	44 \pm 1,5 (1,0)	34 \pm 11,1 (0,9)	136 \pm 8,6 (1,0)	133 \pm 4,5 (0,9)	183 \pm 4,0 (1,1)	144 \pm 4,6 (0,9)	294 \pm 12,9 (1,2)	223 \pm 14,1 (1,0)
1,5	72 \pm 9,7*(1,7)	45 \pm 3,1 (1,3)	152 \pm 13,1 (1,2)	146 \pm 4,0 (1,1)	189 \pm 3,5 (1,1)	141 \pm 10,0 (0,9)	310 \pm 2,0 (1,3)	224 \pm 11,2 (1,0)
FF								
0	29 \pm 21	31 \pm 2,7	141 \pm 8,0	143 \pm 4,0	148 \pm 2,5	143 \pm 5,0	239 \pm 16,7	210 \pm 11,1
0,12	32 \pm 4,0 (1,1)	30 \pm 5,9 (0,9)	142 \pm 20,0 (1,0)	145 \pm 7,9 (1,0)	144 \pm 14,2 (0,9)	145 \pm 4,2 (1,0)	223 \pm 11,0 (0,9)	224 \pm 6,0 (1,1)
0,38	40 \pm 2,5 (1,4)	40 \pm 8,7 (1,3)	132 \pm 7,0 (0,9)	142 \pm 3,1 (0,9)	140 \pm 1,5 (0,9)	145 \pm 6,5 (1,0)	198 \pm 12,5 (0,8)	206 \pm 11,4 (0,9)
0,75	42 \pm 4,0 (1,4)	40 \pm 7,5 (1,3)	138 \pm 3,6 (0,9)	146 \pm 5,1 (1,0)	145 \pm 13,2 (0,9)	156 \pm 12,4 (1,1)	213 \pm 23,3 (0,9)	216 \pm 17,1 (1,0)
1,5	50 \pm 4,9**(1,7)	49 \pm 6,4*(1,6)	156 \pm 9,3 (1,1)	146 \pm 5,9 (1,0)	155 \pm 5,0 (1,0)	154 \pm 6,5 (1,1)	246 \pm 7,4 (1,0)	232 \pm 13,6 (1,1)
2,5	57 \pm 5,0**(1,9)	49 \pm 4,6*(1,6)	158 \pm 3,2 (1,1)	151 \pm 7,8 (1,1)	136 \pm 4,6 (0,9)	142 \pm 7,9 (0,9)	250 \pm 8,3 (1,0)	234 \pm 11,0 (1,1)
FG								
0	29 \pm 2,1	31 \pm 2,7	141 \pm 8,0	143 \pm 4,0	148 \pm 2,5	143 \pm 5,0	239 \pm 16,7	210 \pm 11,1
0,12	38 \pm 4,6 (1,3)	31 \pm 3,6 (1,0)	143 \pm 13,5 (1,0)	137 \pm 5,3 (0,9)	163 \pm 26,1 (1,1)	155 \pm 4,2 (1,1)	267 \pm 14,1 (1,1)	235 \pm 13,1 (1,1)
0,38	32 \pm 5,3 (1,1)	30 \pm 1,5 (0,9)	138 \pm 4,6 (0,9)	143 \pm 4,0 (1,0)	151 \pm 4,2 (1,0)	149 \pm 7,0 (1,0)	247 \pm 7,6 (1,0)	236 \pm 10,3 (1,1)
0,75	42 \pm 13,5 (1,4)	40 \pm 4,5 (1,3)	132 \pm 7,8 (0,9)	148 \pm 3,6 (1,0)	164 \pm 13,9 (1,1)	165 \pm 13,6 (1,2)	245 \pm 5,9 (1,0)	251 \pm 5,1 (1,2)
1,5	39 \pm 5,6 (1,3)	35 \pm 3,6 (1,1)	144 \pm 8,4 (1,0)	138 \pm 7,6 (0,9)	183 \pm 14,1 (1,2)	166 \pm 3,1 (1,2)	250 \pm 6,1 (1,0)	254 \pm 5,6 (1,2)
2,5	40 \pm 4,1 (1,4)	39 \pm 6,0 (1,3)	138 \pm 4,6 (0,9)	143 \pm 6,1 (1,0)	173 \pm 10,1 (1,2)	175 \pm 7,6 (1,2)	251 \pm 6,9 (1,0)	255 \pm 7,2 (1,2)
C. positivo	608 \pm 71,52 (a)	663 \pm 35,4 (b)	711 \pm 12,1 (a)	761 \pm 28,0 (b)	914 \pm 17,6 (c)	886 \pm 49,3 (b)	1076 \pm 57,1 (d)	1082 \pm 72,9 (b)

FA = fração de alcalóides; FF = fração de flavonóides; FG = fração de glicerolipídeos; 0 = controle negativo (DMSO – 100 μ L/placa); controles positivos: ^a NPD (4-nitrofenilenodiamina 10 μ g/placa); ^b 2-antramine (1,25 μ g/placa); ^c azida sódica (1,25 μ g/placa); ^d mitomicina (0,5 μ g/placa). Os valores entre *parentesis* correspondem ao índice de mutagenicidade.

As substâncias isoladas majoritárias dessa espécie também foram testadas, utilizando a linhagem TA98, com e sem ativação metabólica. Considerando os estudos fitoquímicos realizados pelo grupo, enfatizamos a presença de derivados glicosilados do kaempferol como substâncias predominantes na FF dessa espécie. Dessa fração, foi isolado um flavonóide, o kaempferol-3,7-diraminosídeo, o qual foi testado em concentrações que variaram de 0,063 a 0,5 mg/placa. Os resultados obtidos nos ensaios realizados com o flavonóide kaempferol-3,7-diraminosídeo demonstraram indícios de mutagenicidade nas maiores concentrações testadas, com e sem metabolização (tabela 6).

Tabela 6: Atividade mutagênica expressa pela média \pm desvio padrão do número de revertentes/placa com a linhagem TA98 exposta a diferentes concentrações de kaempferol-3,7-dira, sem (-S9) e com (+S9) ativação metabólica.

Tratamento (mg/placa)	TA98 (-S9)	TA98 (+S9)
kaempferol-3,7-diraminosídeo		
0	30 \pm 1,5	36 \pm 4,0
0,063	34 \pm 3,2 (1,1)	42 \pm 2,0 (1,2)
0,125	41 \pm 1,2 (1,4)	52 \pm 2,5 (1,4)
0,25	44 \pm 2,0*(1,5)	54 \pm 2,5*(1,5)
0,50	52 \pm 2,5** (1,7)	56 \pm (4,2)**(1,9)
C. positivo	(a) 1067 \pm 10,4	(b) 1031 \pm 20,1

0 = controle negativo (100 μ L/placa de DMSO); C. positivo = controle positivo: (a) NPD (4-nitro-o-fenilenodiamina 10 μ g/placa); (b) 2-antramine (1,25 μ g/placa). Os valores entre *parentesis* representam os índices de mutagenicidade. ** $p <^* p < 0,05$ 0,01.

A denominada fração enriquecida de glicerolipídeos (FG), na qual foi identificado basicamente, o sitosterol glicosilado, não apresentou efeitos mutagênicos. Estudos de Wolfreys & Hepburn (2002) demonstraram, através de vários ensaios de mutagenicidade com esteróides esterificados, que essas substâncias não ocasionavam danos ao DNA, *in vivo* e *in vitro*. A análise química desses fitoesteróides revelou a presença de estigmasterol, campesterol e sitosterol. Além de não apresentarem efeitos mutagênicos, esses compostos estão relacionados com a utilização segura em outras aplicações

biológicas, como redução dos níveis de colesterol plasmático (KRITCHEVSKY & CHEN, 2005) e prevenção de diferentes tipos de câncer (AWAD & FINK, 2000).

A FA também foi testada e os estudos fitoquímicos identificaram a presença de índigo (indigotina) e indirubina. Os resultados evidenciaram indícios de mutagenicidade da fração, porém, quando os alcalóides isolados foram testados, apresentaram efeitos mutagênicos evidentes. Os alcalóides foram testados com a linhagem TA98, com e sem metabolização, em concentrações que variaram de 0,125 a 1,0 mg/placa (tabela 7). Nos ensaios sem metabolização, o índigo apresentou indícios de mutagenicidade nas maiores concentrações testadas. A indirubina também apresentou mutagenicidade (índice de mutagenicidade 2,1 na maior concentração e significância estatística em nível $p < 0,01$). A isatina apresentou significativa mutagenicidade, com índice de mutagenicidade atingindo 3,7 na maior concentração testada. Após a ativação metabólica, o índigo apresentou evidente efeito mutagênico, com índice de mutagenicidade atingindo 7,7 na maior concentração testada, o que o classificaria como um mutágeno secundário. A indirubina perdeu o efeito mutagênico após a metabolização, assim como a isatina.

Tabela 7: Atividade mutagênica expressa pela média \pm desvio padrão do número de revertentes por placa (linhagem TA98) exposta às substâncias isoladas do extrato metanólico de *I. truxillensis* em várias concentrações, sem (-S9) e com (+S9) ativação metabólica.

Tratamento (mg/placa)	TA98 (-S9)	TA98 (+S9)	TA98 (-S9)	TA98 (+S9)	TA98 (-S9)	TA98 (+S9)
	Índigo		Indirubina		Isatina	
0	30 \pm 1,5	36 \pm 4,0	30 \pm 1,5	36 \pm 4,0	30 \pm 1,5	36 \pm 4,0
0,125	38 \pm 0,6 (1,3)	44 \pm 2,7 (1,2)	46 \pm 2,7 (1,5)	36 \pm 2,0 (1,0)	49 \pm 7,5 (1,6)	32 \pm 2,5 (0,9)
0,25	42 \pm 3,2 (1,4)	86 \pm 5,3** (2,4)	58 \pm 3,8** (1,9)	36 \pm 4,0 (1,0)	58 \pm 2,5** (1,9)	34 \pm 2,0 (0,9)
0,50	45 \pm 1,5 (1,5)	192 \pm 2,5** (5,3)	58 \pm 3,0** (1,9)	38 \pm 2,5 (1,1)	64 \pm 3,1** (2,1)	36 \pm 1,5 (1,0)
0,75	50 \pm 4,0* (1,7)	229 \pm 3,6** (6,7)	63 \pm 1,7** (2,1)	43 \pm 4,0 (1,2)	81 \pm 3,6** (2,7)	38 \pm 1,5 (1,0)
1,00	57 \pm 4,2** (1,9)	276 \pm 5,3** (7,7)	63 \pm 3,6** (2,1)	46 \pm 3,6 (1,3)	111 \pm 7,7** (3,7)	39 \pm 3,1 (1,1)
C. positivo	867 \pm 1,4 (a)	991 \pm 10,1(b)	867 \pm 1,4 (a)	991 \pm 10,1(b)	867 \pm 1,4 (a)	991 \pm 10,1(b)

0 = controle negativo (DMSO – 100 μ L/placa); c. positivos: ^a NPD (4-nitrofenilenodiamina 10 μ g/placa); ^b 2-antramina (1,25 μ g/placa); Os valores entre *parentesis* correspondem ao índice de mutagenicidade.

Existem relatos na literatura sobre a ação tóxica e mutagênica dos alcalóides de diferentes classes estruturais, isolados de espécies vegetais, *in vitro* e *in vivo* (POSER, 1987; RUITÓN et al., 1999; COSTA et al., 2006; ALVES et al., 2007).

O índigo natural é um pó de cor azul escura, encontrado em várias espécies vegetais, inclusive, no gênero *Indigofera* (PANICHAYUPAKARANANT et al., 2005). É utilizado na medicina tradicional chinesa (BENSKY et al., 1986) para o tratamento de infecções virais (MAK et al., 2004), doenças respiratórias inflamatórias (KUNIKATA et al., 2004) e leucemia (WU et al., 1979; WU et al., 1980; CHRISTINA et al., 2003). Também constitui um produto industrial importante (GODOY & PRADO, 2004) e, antes de ser sintetizado, no século XIX, era obtido exclusivamente de plantas (BALFOUR, 1998). Esse pó contém uma grande quantidade de um corante azul, a indigotina (índigo) (ZHANG, 1983; CHEN & XIE, 1984), porém as atividades biológicas citadas são atribuídas ao seu isômero de cor vermelha, a indirubina (isoindigotina) (PANICHAYUPAKARANANT et al., 2005). Atualmente, o índigo pode ser produzido com alto nível de pureza e rendimento, sendo que o produto sintético substitui, gradativamente, o produto extraído diretamente de espécies vegetais (BECHTOLD et al., 2002). O corante alimentar índigo (indigotina) é amplamente utilizado em todo o mundo, uma vez que é considerado um aditivo isento de efeitos colaterais e pouco absorvido (SCHROEDER et al., 2005; JOHN & MACIAS, 2004). Até o momento, não há relatos na literatura que comprovem efeitos tóxicos ou mutagênicos das substâncias puras em preparações de uso interno (ARÁMBULA, 2003), porém, existem alguns estudos que evidenciam os riscos de toxicidade crônica de alimentos ricos em aditivos dessa natureza (HANSEN et al., 1966).

Em uma revisão apurada da literatura verificamos que, realmente, os dados sobre o potencial mutagênico do índigo e da indirubina são raros. Essa realidade reforçou a importância dos resultados obtidos, uma vez que acrescentaram informações interessantes sobre essas moléculas. Segundo estudos de Rannug et al. (1992), que avaliaram extratos

de jeans e a substância pura, foi possível observar os efeitos mutagênicos do índigo em TA98 (+S9). Segundo esses autores, o histórico de mutagenicidade do índigo, de acordo com a literatura, é escasso e contraditório. Em concordância com os estudos de Jongen & Alink (1982), Hesbert et al. (1984) e Rannug et al. (1992), também foi possível evidenciar potencial mutagênico do índigo puro na linhagem TA98 (+S9). Klarpiuk et al. (1984), também avaliaram o potencial tóxico e mutagênico do índigo carmine em sistema bacteriano (*E. coli*) e em ratos, com o objetivo de encontrar um intervalo de segurança na utilização industrial do corante. Estudos muito recentes, utilizando células MCF7 e o ensaio de cometa, evidenciaram o efeito deletério do índigo carmine sobre o DNA (MASANNAT et al., 2009). Os estudos de SCHROEDER et al. (2005) contribuíram para o levantamento de possíveis explicações sobre os resultados obtidos e aos dados da literatura. Existe a informação de que o índigo causa intoxicação e hepatotoxicidade crônica, mas os mecanismos ainda não são elucidados (HANSEN et al., 1966). Segundo Schroeder e seu grupo, o índigo sofre uma biotransformação hepática, conjugando-se com fosfolipídios. Essa conjugação aumenta sua lipossolubilidade, favorecendo seu acúmulo em tecidos adiposos e aumentando os riscos de sua ação tóxica. Extrapolando essas informações para os resultados obtidos *in vitro*, no qual observamos efeito mutagênico após a metabolização, poderíamos sugerir que o aumento da lipossolubilidade do índigo, após sua metabolização, favoreceria a entrada da molécula no ambiente celular e, conseqüentemente, o seu contato com o DNA. Já foi descrito anteriormente que alguns alcalóides são comprovadamente mutagênicos, por vários mecanismos (POSER, 1987; RUITÓN et al., 1999; COSTA et al., 2006; ALVES et al., 2007). Porém, no caso do índigo, a biotransformação hepática seria fundamental para que se tornasse um mutágeno secundário. Antes da metabolização (sem adição da fração S9), o índigo apresentou apenas indícios de mutagenicidade, comprovando, adicionalmente, a importância da biotransformação para que seja mais facilmente absorvido ao ambiente celular.

A indirubina já foi estudada quanto à sua aplicação no tratamento de leucemias, inclusive, na medicina tradicional Chinesa (HAN, 1988; TANG & EISEMBRAND, 1994; HAN, 1995; HOESSEL et al., 1999). Ainda na linha de investigação de novas terapias contra o câncer, se destacam os dados de Libnow et al. (2008), que avaliam derivados de indirubina em diversas linhagens tumorais humanas. Também se tem demonstrado outras atividades terapêuticas de derivados sintéticos da indirubina, como inibição de HIV-1 (HEREDIA et al., 2005) e tratamento de enfermidades autoimunes (ZHANG et al., 2007), entre outras.

Apesar de serem isômeras, essas moléculas apresentaram resultados diferentes no Teste de Ames. O índigo demonstrou ser um mutágeno secundário potencial, enquanto a indirubina, após a adição da fração S9, perdeu esse efeito. Embora não existam relatos sobre a mutagenicidade da indirubina avaliada através do Teste de Ames, poderíamos sugerir que possua um metabolismo hepático diferenciado, o que garantiria sua detoxificação. Essa informação é importante quando associada à aplicação *in vivo* dessa molécula. Segundo estudos clínicos do Indirubin Cooperative Group (1980), o tratamento com indirubina em pacientes com leucemia mielocítica crônica nas doses diárias de 300-450mg mostrou completa diminuição em 26% e parcial diminuição em 33,4% dos 314 casos, mostrando baixa toxicidade e poucos efeitos colaterais (VIEIRA et al., 2007). Uma molécula, cuja metabolização hepática reduz ou inativa seu potencial mutagênico, possui mais um forte indício de segurança na sua utilização.

É importante recordar que essas moléculas (índigo e indirubina), as quais apresentaram efeitos mutagênicos interessantes quando isoladas, não refletiram o mesmo efeito quando misturadas na fração enriquecida de alcalóides. Isso reforça, mais uma vez, a informação de que o sinergismo entre as moléculas, em uma mistura, pode resultar em efeitos difíceis de serem elucidados, ou pelo menos, muito diferentes daqueles observados com as substâncias puras (BORRIS, 1997; YUNES et al., 2001).

A isatina é uma molécula muito utilizada como precursora na síntese de diversas substâncias biologicamente ativas, como, por exemplo, as tiossemicarbazonas, utilizadas como antitumorais, antiparasitárias, entre outros (GOÉS et al., 2005). Na literatura constam alguns estudos que comprovam suas atividades biológicas. Existem evidências sobre a eficácia da isatina ou de seus derivados sintéticos contra SARS coronavírus e HIV (CHEN et al., 2005; BAL et al., 2005), antitumoral (VINE et al., 2007; HOU et al., 2008), anticonvulsivante e inibidora da MAO (SRIDHAR et al., 2002; OGATA et al., 2003), estimulante de NO sintetase e inibidora de COX-2 em macrófagos murinos (MATHEUS et al., 2007), entre outras. Isatina é um dos precursores da biossíntese e da síntese dos alcalóides bis-indólicos encontrados nas espécies de *Indigofera* (CALVO, 2007).

Não existem relatos na literatura sobre a avaliação do potencial mutagênico da isatina utilizando o teste de Ames. Há um estudo realizado em 2005 por Cerchiaro e colaboradores, que sintetizaram derivados de isatina e um deles ($C_{19}H_{16}N_6O_2S$) apresentou mutagenicidade evidente nas linhagens TA100 e TA102. Porém, após metabolização, o efeito mutagênico anteriormente avaliado não foi detectado. No presente trabalho, direcionamos os testes de substâncias puras somente à linhagem TA98, uma vez que nos interessava refletir os resultados obtidos no extrato da espécie vegetal. Ainda que a isatina não seja encontrada na espécie vegetal avaliada, é um precursor sintético de índigo e indirubina, sendo também avaliada nesse contexto. Observamos, nos resultados obtidos, o potencial mutagênico da isatina também na linhagem TA98, o qual desapareceu após a adição da fração microsomal S9. Esses resultados foram interessantes, uma vez que a isatina apresentou atividades significativas em outras atividades biológicas. A tabela 7 mostra os resultados obtidos com os alcalóides presentes nas duas espécies e a molécula precursora da biossíntese vegetal e sintética, isatina.

Alguns trabalhos realizados com *I. suffruticosa* já constam na literatura, evidenciando sua utilização popular na forma de infusões ou decocções indicadas para o tratamento de

enfermidades infecciosas, inflamatórias, entre outras (MATOS, 1999). Sob o ponto de vista científico, existem dados que também demonstram sua aplicação terapêutica como antitumoral (VIEIRA et al., 2006), antimicrobiano e antifúngico (LEITE et al., 2006). É evidente, também, a necessidade de se avaliar os riscos e benefícios da utilização de plantas na terapêutica popular e, no caso de preparações com *I. suffruticosa*, já está documentado o risco de embriotoxicidade dos extratos aquosos das folhas dessa planta em ratos (LEITE et al., 2004). Dessa forma, o estudo fitoquímico detalhado realizado pelo grupo de projeto BIOTA e a necessidade de se investigar os riscos da utilização popular da espécie fortaleceram o interesse em elucidar seu potencial mutagênico.

Os ensaios de mutagenicidade realizados partiram de uma triagem dos extratos, um polar (metanólico) e um apolar (clorofórmico). As linhagens utilizadas foram TA98, TA97a, TA100 e TA102 (tabela 8). As concentrações testadas variaram de entre 1,25 e 7,50 mg/placa. De uma maneira geral, os extratos não apresentaram efeito mutagênico nas concentrações testadas. O extrato metanólico apresentou indícios de mutagenicidade na linhagem TA98, sem metabolização (índice de mutagenicidade 1,8 e significância estatística em nível $p < 0,01$).

As frações de flavonóides, alcalóides e glicerolípideos do extrato metanólico de *I. suffruticosa* não apresentaram efeitos mutagênicos nas concentrações testadas (0,12 – 1,50 mg/placa). Foram apenas observados indícios de mutagenicidade na FA (-S9), com índice de mutagenicidade 1,9, e FF (-S9, +S9), com índices de mutagenicidade 1,9 e 1,5, respectivamente (tabela 9).

Uma vez que os estudos fitoquímicos revelaram a presença de derivados glicosilados da quercetina na fração de flavonóides do extrato metanólico, retomamos, de uma maneira geral, a discussão já apresentada para *B. crassa*. Além disso, a quantidade de flavonóides presentes nessa espécie é menor do que aquela encontrada em *I. truxillensis* (tabela XIV, anexo X). De acordo com as discussões anteriores sobre a quercetina, ressaltamos que

essa molécula é reconhecida por sua capacidade de causar mutações no DNA através de diferentes mecanismos (MACGRAGOR, 1983; GASPAR et al., 1993; SILVA et al., 2002). Porém, os derivados glicosilados da quercetina não apresentam o mesmo potencial mutagênico, uma vez que algumas características estruturais interferem no efeito observado (HEIM et al., 2002).

Embora a fração de alcalóides de *I. suffruticosa* tenha maior concentração de alcalóides bis-indólicos, não foi possível detectar efeito mutagênico na FA, assim como ocorreu em *I. truxillensis*. A fração de glicerolipídeos, com a mesma composição química nas duas espécies, também apresentou mutagenicidade negativa em ambas. Como já mencionado anteriormente, essas frações possuem, basicamente, esteróide glicosilado, molécula já conhecida como não mutagênica (WOLFREYS & HEPBURN, 2002).

A diferença do perfil mutagênico dos extratos metanólicos das duas espécies de *Indigofera* pode estar associada à concentração diferencial de flavonóides (embora sejam derivados glicosilados diferentes, são mais abundantes em *I. truxillensis*). Essa hipótese se fortalece frente aos resultados obtidos com a fração de alcalóides das duas espécies, apesar dos efeitos interessantes obtidos com os alcalóides testados isoladamente.

Em resumo, ressaltamos que a sinergia entre as substâncias é extremamente importante quando consideramos a mutagenicidade do extrato final e das substâncias isoladas (BORRIS, 1997; YUNES et al., 2001). Além disso, a diferença do perfil mutagênico das espécies de *Indigofera* avaliadas nesse trabalho também pode estar relacionada com os perfis distintos de seus flavonóides (núcleo fundamental e concentração), já que os alcalóides são os mesmos (índigo e isatina, embora em concentrações diferentes).

Tabela 8: Atividade mutagênica expressa pela média \pm desvio padrão do número de revertentes/placa em linhagens de *S. typhimurium* (TA98, TA97a, TA100 e TA 102) expostas aos extratos de *I. suffruticosa* em várias concentrações, sem (-S9) e com (+S9) ativação metabólica.

Tratamento (mg/pl)	TA98 (-S9)	TA98 (+S9)	TA97a (-S9)	TA97a (+S9)	TA100 (-S9)	TA100 (+S9)	TA102 (-S9)	TA102 (+S9)
MeOH								
0	43 \pm 2,7	36 \pm 2,0	131 \pm 1,5	139 \pm 2,5	163 \pm 4,2	145 \pm 9,5	242 \pm 9,2	223 \pm 11,9
1,25	38 \pm 4,6 (0,9)	41 \pm 1,2 (1,1)	145 \pm 3,1 (1,1)	138 \pm 2,1 (0,9)	152 \pm 4,0 (0,9)	141 \pm 2,1 (0,9)	262 \pm 2,5 (1,1)	219 \pm 4,9 (0,9)
2,5	43 \pm 4,5 (1,0)	40 \pm 2,7 (1,1)	145 \pm 2,1 (1,1)	142 \pm 4,2 (1,0)	151 \pm 2,1 (0,9)	147 \pm 6,7 (1,0)	244 \pm 7,6 (1,0)	225 \pm 8,5 (1,0)
3,75	62 \pm 2,5 (1,4)	44 \pm 3,1 (1,2)	147 \pm 4,0 (1,1)	145 \pm 2,1 (1,0)	161 \pm 2,7 (0,9)	146 \pm 7,5 (1,0)	249 \pm 6,7 (1,0)	242 \pm 5,0 (1,1)
5,00	66 \pm 1,5** (1,5)	44 \pm 3,1 (1,2)	153 \pm 5,0 (1,2)	142 \pm 6,4 (1,0)	165 \pm 3,1 (1,0)	152 \pm 6,2 (1,0)	250 \pm 6,1 (1,0)	234 \pm 7,9 (1,0)
7,50	76 \pm 5,9** (1,8)	45 \pm 3,5 (1,2)	159 \pm 7,8 (1,2)	151 \pm 5,1 (1,0)	156 \pm 1,5 (0,9)	149 \pm 6,0 (1,0)	253 \pm 3,5 (1,0)	237 \pm 9,6 (1,1)
CLO								
0	43 \pm 2,7	36 \pm 2,0	131 \pm 1,5	139 \pm 2,5	163 \pm 4,2	145 \pm 9,5	242 \pm 9,2	223 \pm 11,9
1,25	33 \pm 4,2 (0,8)	39 \pm 5,0 (1,1)	139 \pm 5,6 (1,1)	141 \pm 2,1 (1,0)	157 \pm 3,0 (0,9)	154 \pm 1,2 (1,1)	243 \pm 4,5 (1,0)	238 \pm 6,2 (1,1)
2,50	35 \pm 2,1 (0,8)	38 \pm 3,5 (1,1)	148 \pm 6,4 (1,1)	136 \pm 7,9 (0,9)	158 \pm 4,0 (0,9)	151 \pm 6,7 (1,0)	241 \pm 2,5 (0,9)	225 \pm 11,3 (1,0)
3,75	39 \pm 3,1 (0,9)	39 \pm 1,5 (1,1)	142 \pm 4,1 (1,1)	142 \pm 3,1 (1,0)	163 \pm 5,1 (1,0)	153 \pm 8,9 (1,1)	230 \pm 2,0 (0,9)	223 \pm 8,1 (1,0)
5,00	46 \pm 3,1 (1,0)	38 \pm 5,0 (1,1)	135 \pm 2,6 (1,0)	141 \pm 2,7 (1,0)	167 \pm 8,5 (1,0)	157 \pm 9,3 (1,1)	237 \pm 6,0 (0,9)	227 \pm 4,5 (1,0)
7,50	55 \pm 2,7 (1,3)	36 \pm 2,5 (1,0)	134 \pm 3,1 (1,0)	143 \pm 5,5 (1,0)	161 \pm 5,3 (0,9)	160 \pm 3,6 (1,0)	249 \pm 7,4 (1,0)	243 \pm 3,2 (1,1)
C. positivo	466 \pm 34,1 (a)	607 \pm 30,3 (b)	703 \pm 24,7 (a)	750 \pm 55,7 (b)	955 \pm 33,0 (c)	797 \pm 32,1 (b)	1158 \pm 65,8 (d)	1158 \pm 49,4 (b)

MeOH = extrato metanólico; CLO = extrato clorofórmico; 0 = controle negativo (DMSO – 100 μ L/placa); controles positivos: ^a NPD (4-nitrofenilenediamina 10 μ g/placa); ^b 2-antramine (1,25 μ g/placa); ^c azida sódica (1,25 μ g/placa); ^d mitomicina (0,5 μ g/placa). Os valores entre *parentesis* correspondem ao índice de mutagenicidade.

Tabela 9: Mutagenicidade expressa pela média \pm desvio padrão do número de revertentes/placa em linhagens de *S. typhimurium* (TA98, TA97a, TA100 e TA 102) expostas às frações do extrato metanólico de *I. suffruticosa* em várias concentrações, sem (-S9) e com (+S9) ativação metabólica.

Tratamento (mg/pl)	TA98 (-S9)	TA98 (+S9)	TA97a (-S9)	TA97a (+S9)	TA100 (-S9)	TA100 (+S9)	TA102 (-S9)	TA102 (+S9)
FA								
0	43 \pm 2,7	36 \pm 2,0	131 \pm 1,5	139 \pm 2,5	148 \pm 2,5	143 \pm 5,0	239 \pm 16,7	210 \pm 11,1
0,12	46 \pm 1,5 (1,1)	31 \pm 1,7 (0,9)	142 \pm (1,0)	139 \pm 1,2 (1,0)	151 \pm 2,3 (1,0)	140 \pm 2,7 (0,9)	255 \pm 4,2 (1,1)	228 \pm 5,7 (1,1)
0,38	50 \pm 2,0 (1,2)	38 \pm 1,5 (1,1)	146 \pm 1,2 (1,1)	139 \pm 3,1 (1,0)	153 \pm 2,5 (1,0)	145 \pm 3,0 (1,0)	269 \pm 1,2 (1,1)	239 \pm 4,2 (1,1)
0,75	69 \pm 1,2*(1,6)	40 \pm 1,5 (1,1)	152 \pm 2,0 (1,0)	143 \pm 3,1 (1,0)	165 \pm 3,8 (1,1)	149 \pm 2,1 (1,0)	278 \pm 5,3 (1,2)	243 \pm 5,9 (1,2)
1,50	85 \pm 1,5**(1,9)	47 \pm 1,2 (1,3)	152 \pm 1,2 (1,2)	143 \pm 1,5 (1,1)	180 \pm 2,0 (1,2)	154 \pm 2,5 (1,1)	306 \pm 7,2 (1,3)	255 \pm 4,7 (1,2)
FF								
0	43 \pm 2,7	36 \pm 2,0	131 \pm 1,5	139 \pm 2,5	148 \pm 2,5	143 \pm 5,0	239 \pm 16,7	210 \pm 11,1
0,12	45 \pm 1,5 (1,0)	42 \pm 2,0 (1,2)	142 \pm 1,5 (1,0)	136 \pm 2,0 (1,0)	149 \pm 4,2 (1,0)	136 \pm 3,1 (0,9)	244 \pm 3,2 (1,0)	219 \pm 8,1 (1,0)
0,38	52 \pm 1,5 (1,0)	43 \pm 4,5 (1,2)	142 \pm 1,0 (1,0)	139 \pm 3,1 (1,0)	152 \pm 3,6 (1,0)	140 \pm 2,5 (0,9)	249 \pm 2,1 (1,0)	239 \pm 6,1 (1,1)
0,75	63 \pm 3,1 (1,5)	48 \pm 1,2 (1,3)	144 \pm 3,1 (1,1)	141 \pm 2,1 (1,0)	153 \pm 5,5 (1,0)	142 \pm 2,1 (0,9)	248 \pm 26,2 (1,0)	243 \pm 5,0 (1,2)
1,50	81 \pm 1,5**(1,9)	54 \pm 2,5**(1,5)	149 \pm 1,5 (1,1)	144 \pm 3,2 (1,0)	158 \pm 2,0 (1,1)	143 \pm 2,0 (1,0)	272 \pm 6,2 (1,1)	264 \pm 4,7 (1,3)
FG								
0	43 \pm 2,7	36 \pm 2,0	131 \pm 1,5	139 \pm 2,5	148 \pm 4,2	143 \pm 5,0	239 \pm 16,7	210 \pm 11,1
0,12	46 \pm 1,7 (1,1)	35 \pm 2,0 (0,9)	131 \pm 2,1 (1,0)	136 \pm 3,5 (0,9)	159 \pm 4,2 (1,1)	145 \pm 3,0 (1,0)	251 \pm 7,0 (1,1)	227 \pm 7,6 (1,1)
0,38	47 \pm 1,5 (1,1)	38 \pm 2,5 (1,1)	134 \pm 3,1 (1,0)	135 \pm 3,1 (0,9)	160 \pm 2,0 (1,1)	147 \pm 3,1 (1,0)	260 \pm 6,0 (1,1)	235 \pm 5,0 (1,1)
0,75	50 \pm 1,5 (1,2)	42 \pm 1,5 (1,2)	139 \pm 5,0 (1,1)	138 \pm 1,2 (0,9)	163 \pm 3,1 (1,1)	152 \pm 2,1 (1,1)	264 \pm 8,4 (1,1)	247 \pm 5,0 (1,2)
1,50	55 \pm 3,6 (1,1)	45 \pm 1,6 (1,3)	143 \pm 2,5 (1,1)	142 \pm 2,5 (1,1)	170 \pm 1,5 (1,1)	160 \pm 2,0 (1,1)	265 \pm 5,0 (1,1)	255 \pm 5,0 (1,2)
C. positivo	466 \pm 34,1 (a)	607 \pm 30,3 (b)	703 \pm 24,7 (a)	750 \pm 55,7 (b)	955 \pm 33,0 (c)	797 \pm 32,1 (b)	1158 \pm 65,8 (d)	1158 \pm 49,4 (b)

FA = fração de alcalóides; FF = fração de flavonóides; FG = fração de glicerolípídeos; 0 = controle negativo (DMSO – 100 μ L/placa); controles positivos: ^a NPD (4-nitrofenilenediamino 10 μ g/placa); ^b 2-antramina (1,25 μ g/placa); ^c azida sódica (1,25 μ g/placa); ^d mitomicina (0,5 μ g/placa). Os valores entre *parentesis* correspondem ao índice de mutagenicidade.

5.2. Avaliação da atividade fitoestrogênica

Existe uma grande evidência epidemiológica de que a dieta alimentar esteja relacionada ao desenvolvimento do câncer de mama, sendo um fator importante em sua etiologia (OLEA et al., 1999). Essa idéia fortalece o foco da quimioproteção, estimulando vários grupos de investigação a buscarem constituintes no meio ambiente e na dieta com propriedades anti-câncer (ANDROUTSOPOULOS et al., 2009). Entre os agentes utilizados na quimioproteção se destacam os moduladores seletivos de receptores estrogênicos (SERM's), os inibidores de aromatase, entre outros.

O interesse por derivados de plantas com potencial estrogênico tem aumentado e existem muitos estudos sobre os efeitos dos mesmos no tratamento de doenças cardiovasculares, sintomas da menopausa e prevenção de câncer (CORNWELL et al, 2004). Também existem dados epidemiológicos que sugerem que os cânceres de mama e próstata são menos incidentes nos países asiáticos, devido à maior ingestão de fitohormônios na dieta (MOGHADASIAN, 2000; STROHECKER et al., 2004).

Os fitoestrogênios são fenóis que apresentam ação estrogênica através da ligação aos receptores estrogênicos. São vários os mecanismos pelos quais essas moléculas podem exercer sua ação, incluindo propriedades anti-proliferativas, modulação de enzimas envolvidas na esteroidogênese e proteínas de ligação, indução da apoptose e provável ação anti-angiogênica (WAGNER et al., 2001). Já foi demonstrado que, na ausência de estrogênio, essas moléculas possuem efeito estrogênico fraco, ao passo que, na presença de estrogênio, podem exercer ações antagônicas, sugerindo mecanismo competitivo pelo receptor (OLIVEIRA et al., 2006).

Existem substâncias, classificadas como flavonóides, que possuem a características fitoestrogênicas. Os mais freqüentemente estudados são os iso-flavonóides, os quais podem modular a resposta estrogênica *in vitro* (MICSICEK, 1993) e em *vivo* (FABER & HUGHES, 1993). Estudos realizados com populações cuja dieta é rica em fitoestrogênios sugerem que

estas substâncias possam atuar como fatores de proteção contra as neoplasias hormônio-dependentes, embora esse mecanismo ainda não seja esclarecido na íntegra (BREINHOLT, 1999). Existem evidências recentes sobre outras classes de flavonóides (além das isoflavonas) com atividade fitoestrogênica (MICSICEK, 1994). Essas substâncias são amplamente distribuídas nas dietas, principalmente aquelas onde predominam vegetais e frutas (DOLL, 1990).

A aromatase é uma enzima da família do citocromo P450 que catalisa a conversão de androgênios em estrogênios, agindo como moduladora da síntese desses hormônios principalmente após a menopausa, período em que há redução da atividade ovariana. Nessa fase, a supra-renal passa a ser a principal fonte de esteróides sexuais, produzidos na forma de androgênios, que são convertidos pela aromatase (também conhecida como estrógeno sintetase) em tecidos periféricos (PUROHIT et al., 2002). Embora essa enzima seja predominante no tecido periférico (principalmente adiposo), ela também está localizada no interior de células de carcinoma mamário e acredita-se ser responsável pelo aumento na taxa de proliferação desse tumor (PRICHARD et al., 2003). Já foi demonstrado que as concentrações de estradiol no câncer de mama podem estar até 20 vezes maiores que as taxas normais, o que reflete uma grande atividade da aromatase nessa neoplasia (SUN et al., 1997). Os inibidores da aromatase determinam, dessa forma, diminuição nas concentrações de estrogênio, fato que se destaca no cenário da prevenção do câncer mamário, principalmente em mulheres que estão no período pós-menopausa (OLIVEIRA et al., 2006). Estudos científicos, *in vitro* ou *in vivo*, devem ser realizados para que essas informações possam ser devidamente interpretadas e confirmadas (ROSA LIMA, 2006). A base da metodologia e-screen é a capacidade de detectar substâncias capazes de inibir ou induzir a proliferação de células estrógeno-dependentes de acordo com a concentração de estrogênio endógeno presente. Com esse propósito, foram utilizadas nos experimentos as células MCF7 - clone BUS (câncer de mama humano), as quais apresentam um alto

potencial proliferativo na presença de estrogênio, segundo um estudo comparativo de clones celulares realizado por Villalobos et al., (1995).

A figura 11 e a tabela 10 representam o efeito proliferativo das principais concentrações da curva de estradiol em células MCF7 BUS. Modificações simples na metodologia inicial (adição de estradiol, testosterona ou antagonista) permitem obter outras respostas interessantes sobre a substância teste, elucidando mais detalhadamente seu mecanismo de ação.

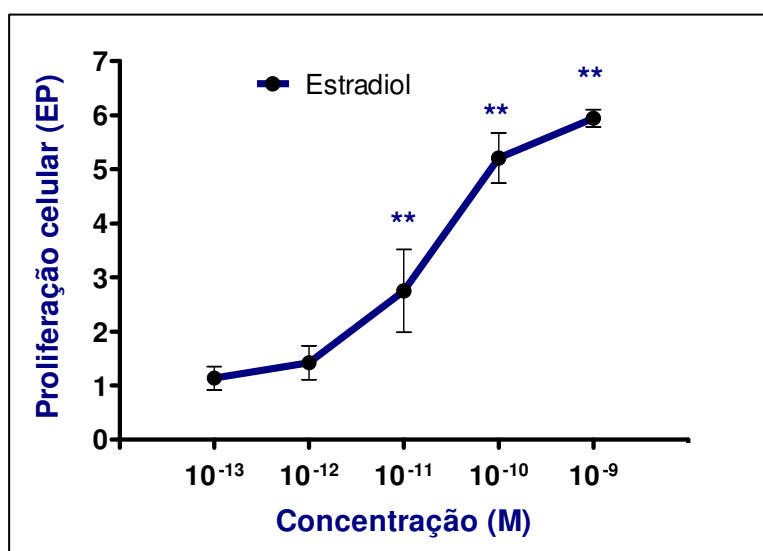


Figura 12: Principais concentrações da curva de estradiol.

Foram utilizadas suspensões de culturas de células MCF7 BUS (concentração de 4×10^4 células/mL). Após incubação por 144 horas na presença de diferentes concentrações de estradiol (Villalobos et al., 1995), foi utilizada a técnica colorimétrica de sulforodamina-B para determinação da proliferação celular. Células na presença de solvente e meio de cultura (DMEM sem vermelho de fenol) foram utilizadas como controle negativo, equivalendo a um EP de 1,0. Cada ponto e barra representa a média \pm desvio padrão dos valores de EP de 4 replicatas em 3 experimentos independentes. A estatística foi realizada através da análise de variância (ANOVA), utilizando o pós-teste de Dunnett.

** $p < 0,01$ quando comparado ao controle negativo.

Tabela 10: Efeito proliferativo das principais concentrações da curva de estradiol (e-screen).

Efeito proliferativo (EP) – ESTRADIOL					
	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Média	DP
1×10^{-13} M	5,76	6,05	6,02	5,94	0,16
1×10^{-12} M	5,72	5,08	4,82	5,20	0,46
1×10^{-11} M	3,63	2,37	2,25	2,75	0,76
1×10^{-10} M	1,75	1,39	1,13	1,42	0,31
1×10^{-9} M	1,32	1,19	0,90	1,13	0,22

A amentoflavona, assim como as demais substâncias, foi testada por e-screen nas concentrações que variaram entre 10^{-9} e 10^{-5} M (figura 13, tabela 11). Não existem dados na literatura sobre outros estudos relacionados à atividade estrogênica ou anti-estrogênica da amentoflavona (via receptor ou via enzimática). Através do método e-screen, esses resultados foram negativos. Esse biflavonóide é composto por duas moléculas de apigenina, molécula cuja atividade estrogênica já foi comprovada (WUTTKE et al., 2003). Esses pesquisadores evidenciaram o potencial estrogênico da apigenina sobre receptores estrogênicos ER β . Embora as células MCF7 clone BUS possuam predominância de receptores ER α , é possível sugerir que a amentoflavona, por sua estrutura, não possa interagir da mesma forma que o seu monômero nos receptores estrogênicos, apresentando resultados negativos para essas atividades. Estudos sobre a metabolização da amentoflavona ou a hidrólise enzimática poderiam elucidar possíveis mecanismos estrogênicos detectáveis *in vitro* ou *in vivo*.

O ácido gálico também apresentou efeito negativo em todas as concentrações testadas por e-screen sobre ER α (figura 14, tabela 12). Não existem dados na literatura sobre estudos de estrogenicidade envolvendo essa substância.

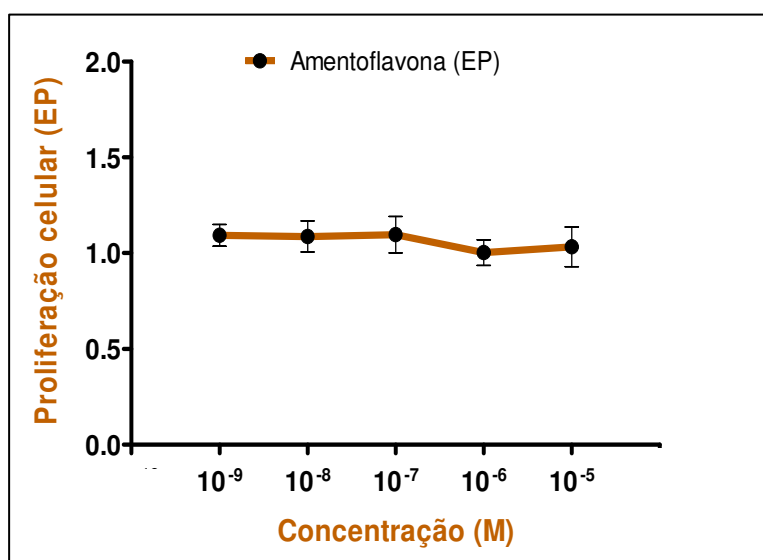


Figura 13: Proliferação celular com amentoflavona.

Foram utilizadas suspensões de culturas de células MCF7 BUS (concentração de 4×10^4 células/mL). Após incubação por 144 horas na presença de diferentes concentrações de amentoflavona, foi utilizada a técnica colorimétrica de sulforodamina-B para determinação da proliferação celular. Células na presença de solvente e meio de cultura (DMEM sem vermelho de fenol) foram utilizadas como controle negativo, equivalendo a um EP de 1,0. Cada ponto e barra representa a média \pm desvio padrão dos valores de EP de 4 replicatas em 3 experimentos independentes. A estatística foi realizada através da análise de variância (ANOVA), utilizando o pós-teste de Dunnett.

Tabela 11: Proliferação celular da amentoflavona (e-screen).

Efeito proliferativo (EP) - Amentoflavona					
	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Média	DP
1×10^{-9} M	1,03	1,14	1,11	1,09	0,06
1×10^{-8} M	1,03	1,05	1,18	1,09	0,08
1×10^{-7} M	0,99	1,17	1,13	1,09	0,10
1×10^{-6} M	0,96	1,08	0,97	1,00	0,07
1×10^{-5} M	0,95	1,15	1,00	1,03	0,10

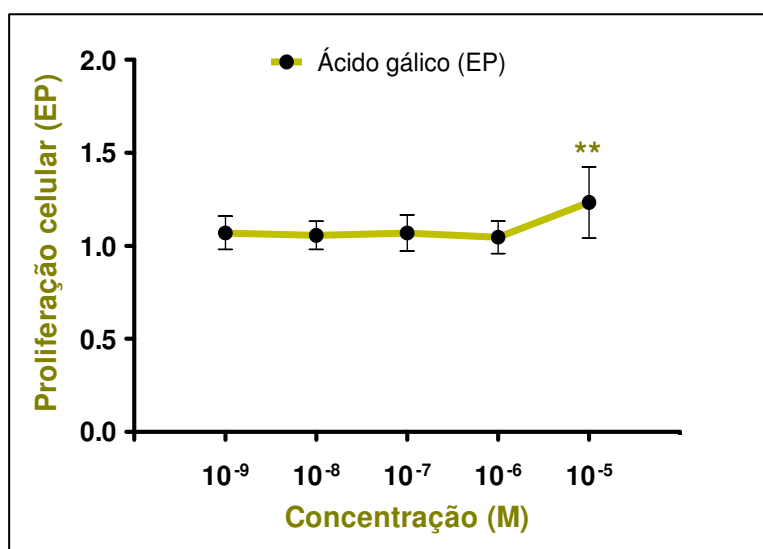


Figura 14: Proliferação celular com ácido gálico.

Foram utilizadas suspensões de culturas de células MCF7 BUS (concentração de 4×10^4 células/mL). Após incubação por 144 horas na presença de diferentes concentrações de ácido gálico, foi utilizada a técnica colorimétrica de sulforodamina-B para determinação da proliferação celular. Células na presença de solvente e meio de cultura (DMEM sem vermelho de fenol) foram utilizadas como controle negativo, equivalendo a um EP de 1,0. Cada ponto e barra representa a média \pm desvio padrão dos valores de EP de 4 replicatas em 3 experimentos independentes. A estatística foi realizada através da análise de variância (ANOVA), utilizando o pós-teste de Dunnett.

** $p < 0,01$ quando comparado ao controle negativo.

Tabela 12: Proliferação celular do ácido gálico (e-screen).

Efeito proliferativo (EP) – Ácido gálico					
	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Média	DP
1×10^{-9} M	0,98	1,16	1,07	1,07	0,09
1×10^{-8} M	0,97	1,09	1,11	1,06	0,08
1×10^{-7} M	0,96	1,14	1,11	1,07	0,09
1×10^{-6} M	0,95	1,07	1,12	1,04	0,09
1×10^{-5} M	1,06	1,20	1,44	1,23	0,19

Considerando a atividade estrogênica das moléculas avaliadas, destacamos os resultados obtidos com kaempferol - 3,7 diraminosídeo (figura 15, tabela 13) e com rutina (figura 16, tabela 14).

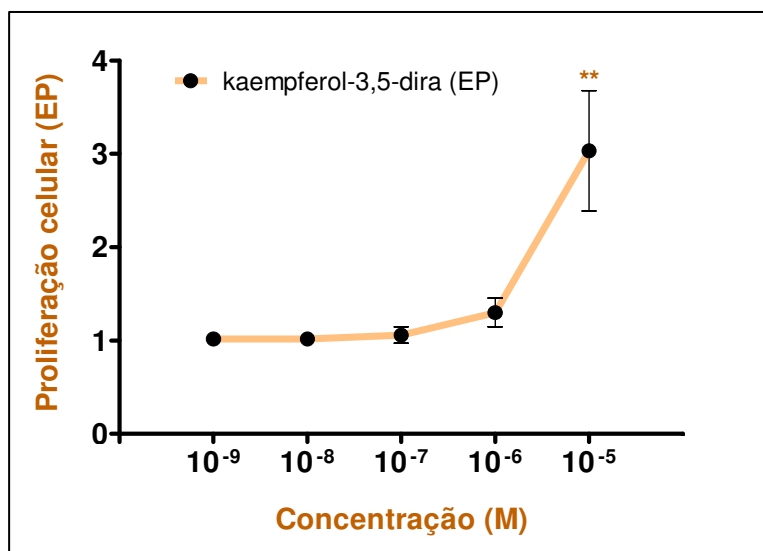


Figura 15: Proliferação celular com kaempferol-3,7-dira.

Foram utilizadas suspensões de culturas de células MCF7 BUS (concentração de 4×10^4 células/mL). Após incubação por 144 horas na presença de diferentes concentrações de kaempferol-3,7-dira, foi utilizada a técnica colorimétrica de sulforodamina-B para determinação da proliferação celular. Células na presença de solvente e meio de cultura (DMEM sem vermelho de fenol) foram utilizadas como controle negativo, equivalendo a um EP de 1,0. Cada ponto e barra representa a média \pm desvio padrão dos valores de EP de 4 replicatas em 3 experimentos independentes. A estatística foi realizada através da análise de variância (ANOVA), utilizando o pós-teste de Dunnett.

** p < 0,01 quando comparado ao controle negativo.

Tabela 13: Proliferação celular do kaempferol-3,7-dira (e-screen).

Efeito proliferativo (EP) – Kaempferol-3,7-dira					
	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Média	DP
1x10 ⁻⁹ M	1,00	0,98	1,07	1,02	0,05
1x10 ⁻⁸ M	1,03	0,98	1,04	1,02	0,03
1x10 ⁻⁷ M	1,05	0,98	1,15	1,06	0,09
1x10 ⁻⁶ M	1,26	1,47	1,17	1,30	0,15
1x10 ⁻⁵ M	3,12	3,63	2,35	3,03	0,64

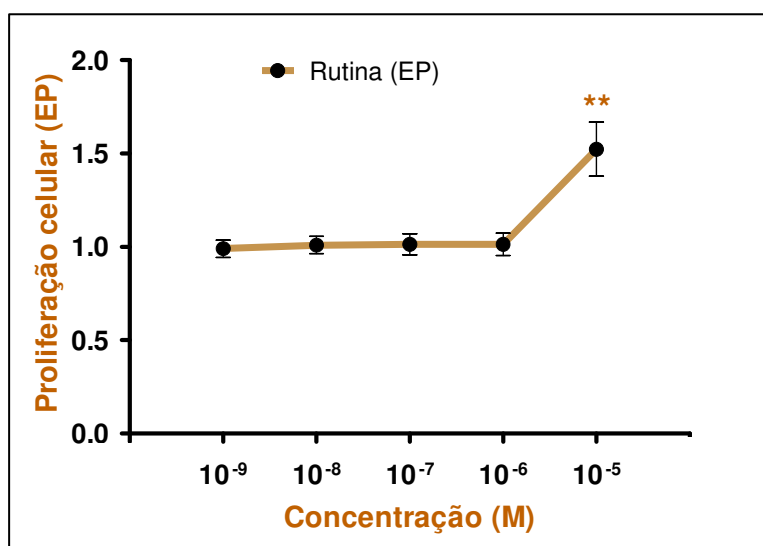


Figura 16: Ensaio de proliferação celular com rutina.

Foram utilizadas suspensões de culturas de células MCF7 BUS (concentração de 4×10^4 células/mL). Após incubação por 144 horas na presença de diferentes concentrações de rutina, foi utilizada a técnica colorimétrica de sulforodamina-B para determinação da proliferação celular. Células na presença de solvente e meio de cultura (DMEM sem vermelho de fenol) foram utilizadas como controle negativo, equivalendo a um EP de 1,0. Cada ponto e barra representa a média \pm desvio padrão dos valores de EP de 4 replicatas em 3 experimentos independentes. A estatística foi realizada através da análise de variância (ANOVA), utilizando o pós-teste de Dunnett.

** $p < 0,01$ quando comparado ao controle negativo.

Tabela 14: Proliferação celular da rutina (e-screen).

Efeito proliferativo (EP) - Rutina					
	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Média	DP
1x10 ⁻⁹ M	0,94	1,03	1,00	1,00	0,05
1x10 ⁻⁸ M	0,97	1,01	1,06	1,01	0,05
1x10 ⁻⁷ M	0,95	1,06	1,04	1,02	0,06
1x10 ⁻⁶ M	0,95	1,07	1,03	1,02	0,06
1x10 ⁻⁵ M	1,38	1,52	1,67	1,52	0,15

Existem relatos na literatura sobre estudos relacionados à atividade estrogênica do kaempferol e da rutina. Segundo Oh & CHUNG (2004), que realizaram estudos de afinidade do extrato de *Ginkgo biloba* e kaempferol puro aos receptores E α e E β , foi possível comprovar que esse flavonóide apresenta essa atividade para ambos os tipos de receptores, inclusive mais acentuada para o E β . Esse mesmo grupo realizou ensaios para comprovar o

mecanismo de estrogenicidade do kaempferol via receptor (e-screen com células MCF7ER+ e MDA-BDER-) e também e-screen com MCF7 na presença de TM (tamoxifeno, antagonista ER). Os resultados positivos no primeiro e negativos no último sugerem o mecanismo de estrogenicidade do kaempferol via clássica, ou seja, pela interação com ER. As células MCF7 clone BUS possuem maior concentração de receptores ER α . Dessa forma, seriam importantes novos estudos do derivado glicosilado do kaempferol em outros clones que hiper-expressem ER β .

Estudos de Stroheker et al. (2004) sobre a atividade estrogênica de alguns flavonóides, entre eles o kaempferol, também demonstraram por e-screen que esse flavonóide possui atividade estrogênica cujo mecanismo está relacionado aos receptores do estrogênio. Os estudos de Shen et al. (2007) também evidenciam o potencial estrogênico do kaempferol aglicona em receptores ER β , utilizando a técnica de reportagem gênica com células HeLa transfectadas com receptores estrogênicos. Com base nos dados da literatura, verificamos que o kaempferol tem um potencial estrogênico em receptores ER β . Da mesma forma, Zoechling et al. (2009), avaliando a atividade estrogênica de vinhos, associaram seus resultados à afinidade do kaempferol aos receptores estrogênicos, com mais força em ER β que em ER α .

É possível considerarmos a possibilidade, em estudos sobre uma nova preparação farmacêutica, da utilização de enzimas específicas que quebrem o açúcar da molécula, liberando o kaempferol aglicona, além da utilização de células com maior concentração de receptores ER β , o que proporcionaria, provavelmente, uma atividade mais evidente da molécula isolada de *I. truxillensis*.

A rutina apresentou um fraco efeito estrogênico na maior concentração testada por e-screen (10^{-5} M), embora existam trabalhos que relatem sua atividade negativa. Segundo Innocenti et al. (2007), a rutina apresentou atividade estrogênica negativa em ensaios de indução de luciferase, tanto em células MCF7 quanto SN-KBE transfectadas com receptores

RE α e RE β . Também segundo Oberdörster et al. (2001), essa molécula apresentou atividade negativa nos ensaios de diferenciação celular e reportagem gênica. Não constam na literatura estudos sobre a avaliação da atividade estrogênica da rutina por e-screen com células MCF7 RE α +. A rutina é um flavonol glicosilado e, seguindo o mesmo raciocínio utilizado na interpretação dos resultados do 3,7-dira, podemos sugerir que a quebra do açúcar liberaria um metabólito ativo, similar à quercetina, o que poderia aumentar a atividade dessa molécula.

Tabela 15: Resumo da análise estatística dos parâmetros de atividade estrogênica (e-screen).

Substância	Concentração	EP	PPR (%)	EPR (%)
Estradiol-17 β	100 pM	5,94 \pm 0,16	100	100
Amentoflavona	10 μ M	1,03 \pm 0,10	-	-
Rutina	10 μ M	1,52 \pm 0,15	0,001	28,18
Ácido gálico	10 μ M	1,23 \pm 0,19	0,001	22,57
K-3,7-dira	10 μ M	3,03 \pm 0,64	0,001	56,21

EP: Efeito proliferativo ou taxa máxima de proliferação para cada substância na concentração ótima (M \pm DE). **PPR:** Potência proliferativa relativa calculada como a razão entre a concentração na qual a substância apresenta máxima capacidade proliferativa e aquela na qual o estradiol apresenta seu máximo efeito (%); **EPR:** Eficácia proliferativa relativa calculada como a taxa máxima de proliferação de cada substância dividida pela taxa máxima de proliferação do estradiol (%).

As substâncias que apresentaram atividade estrogênica foram reavaliadas na presença de ICI (antagonista de receptores estrogênicos), na concentração de 10⁻⁶M, para verificação do mecanismo via receptor. Moléculas que são estrogênicas via receptor, na presença de um antagonista, não podem atuar, não havendo proliferação celular. Os resultados obtidos com o kaempferol-3,7-diraminosídeo (figura 17, tabela 16) e com a rutina (figura 19, tabela 17) demonstram o efeito estrogênico via receptor.

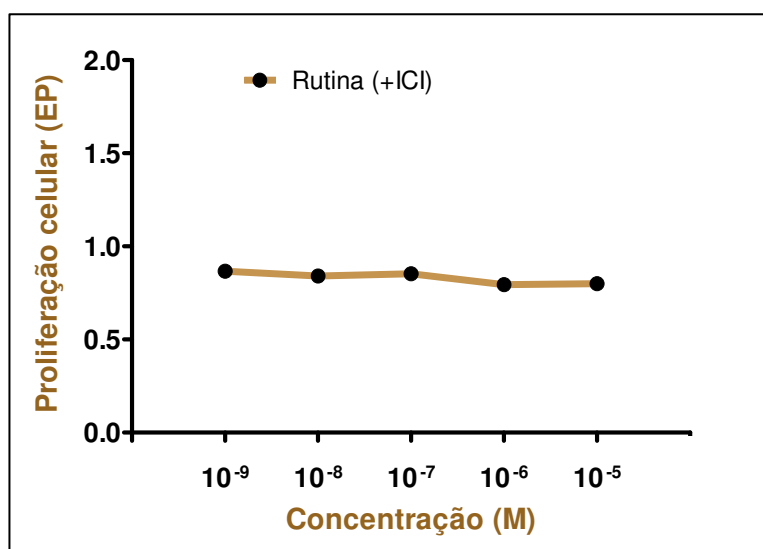


Figura 17: Proliferação celular com rutina na presença de ICI.

Foram utilizadas suspensões de células MCF7 BUS (concentração de 4×10^4 células/mL). Após a incubação por 144 horas na presença de diferentes concentrações de rutina e 10^{-6} M de ICI, foi utilizada a técnica de sulforodamina-B para a determinação da proliferação celular. Células na presença de solvente e meio de cultura (DMEM sem vermelho de fenol) foram utilizadas como controle negativo, equivalendo a um EP de 1,0. Cada ponto e barra representa a média \pm desvio padrão dos valores de EP de 4 replicatas em 3 experimentos independentes. A estatística foi realizada através da análise de variância (ANOVA), utilizando o pós-teste de Dunnett.

Tabela 16: Estrogenicidade da rutina com antagonista (ICI).

Efeito proliferativo (Rutina + ICI)					
	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Média	DP
1×10^{-9} M	0,90	0,85	0,85	0,87	0,03
1×10^{-8} M	0,85	0,85	0,82	0,84	0,02
1×10^{-7} M	0,88	0,83	0,85	0,85	0,03
1×10^{-6} M	0,82	0,76	0,80	0,79	0,03
1×10^{-5} M	0,80	0,79	0,81	0,80	0,01

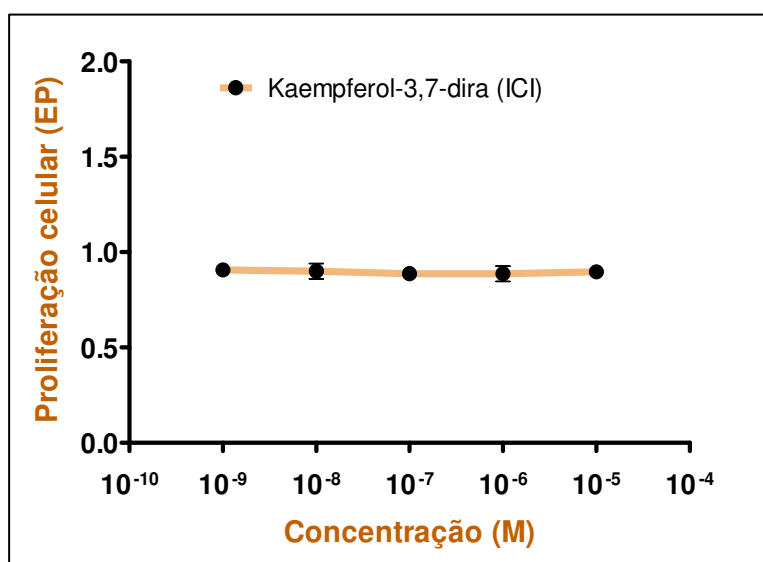


Figura 18: Proliferação celular com kaempferol-3,7-dira na presença de ICI.

Foram utilizadas suspensões de células MCF7 BUS (concentração de 4×10^4 células/mL). Após a incubação por 144 horas na presença de diferentes concentrações de kaempferol-3,7-dira e 10^{-6} M de ICI, foi utilizada a técnica de sulforodamina-B para a determinação da proliferação celular. Células na presença de solvente e meio de cultura (DMEM sem vermelho de fenol) foram utilizadas como controle negativo, equivalendo a um EP de 1,0. Cada ponto e barra representa a média \pm desvio padrão dos valores de EP de 4 replicatas em 3 experimentos independentes. A estatística foi realizada através da análise de variância (ANOVA), utilizando o pós-teste de Dunnett.

Tabela 17: Estrogenicidade do kaempferol-3,7-dira com antagonista (ICI).

Efeito proliferativo (Kaempferol-3,7-dira + ICI)					
	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Média	DE
1×10^{-9} M	0,93	0,93	0,90	0,91	0,02
1×10^{-8} M	0,94	0,93	0,90	0,90	0,04
1×10^{-7} M	0,86	0,92	0,88	0,89	0,03
1×10^{-6} M	0,85	0,93	0,88	0,89	0,04
1×10^{-5} M	0,86	0,93	0,90	0,89	0,02

A avaliação da atividade anti-estrogênica não demonstrou resultados significativos para nenhuma das moléculas avaliadas nesse trabalho, tanto via receptor como por inibição da aromatase. Não existem estudos relacionados à atividade anti-estrogênica das moléculas avaliadas. Os resultados de atividade anti-estrogênica na presença de estradiol obtidos com amentoflavona (tabela 18), ácido gálico (tabela 19), rutina (tabela 20) e kaempferol-3,7-diraminosídeo (tabela 21) estão representados a seguir, assim como os ensaios de inibição de aromatase na presença de testosterona obtidos com amentoflavona (tabela 22), ácido gálico (tabela 23), rutina (tabela 24) e kaempferol-3,7-diraminosídeo (tabela 25).

A tabela 26 resume a análise estatística dos resultados obtidos nos ensaios de atividade anti-estrogênica via receptor e inibição de aromatase (4 replicatas, 3 experimentos independentes). As concentrações representadas correspondem às maiores concentrações (M) em que houve efeito anti-estrogênico/inibidor ou, na ausência de efeito, a maior concentração testada.

Tabela 18: Atividade anti-estrogênica na presença de estradiol – amentoflavona.

Efeito anti-proliferativo (Amentoflavona + Estradiol – 10⁻¹⁰M)					
	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Média	DE
1x10⁻⁹ M	4,50	5,14	4,82	4,82	0,32
1x10⁻⁸ M	4,74	5,13	4,92	4,93	0,20
1x10⁻⁷ M	4,93	5,06	4,98	4,99	0,07
1x10⁻⁶ M	4,80	5,06	4,99	4,95	0,13
1x10⁻⁵ M	4,75	5,12	4,98	4,95	0,19

Controle de estradiol: 4,95 ± 0,12.

Tabela 19: Atividade anti-estrogênica na presença de estradiol – ácido gálico.

Efeito anti-proliferativo (Ácido gálico + Estradiol – 10⁻¹⁰M)					
	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Média	DE
1x10⁻⁹ M	4,72	5,05	5,03	4,93	0,19
1x10⁻⁸ M	5,01	5,11	5,10	5,07	0,06
1x10⁻⁷ M	4,91	5,04	5,08	5,01	0,09
1x10⁻⁶ M	5,15	5,14	5,05	5,11	0,06
1x10⁻⁵ M	4,92	5,10	5,02	5,01	0,09

Controle de estradiol: 5,11 ± 0,08.

Tabela 20: Atividade anti-estrogênica na presença de estradiol – rutina.

Efeito anti-proliferativo (Rutina + Estradiol – 10⁻¹⁰M)					
	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Média	DE
1x10⁻⁹ M	4,75	4,92	4,92	4,86	0,10
1x10⁻⁸ M	4,73	5,10	4,89	4,91	0,19
1x10⁻⁷ M	4,79	5,05	4,94	4,93	0,13
1x10⁻⁶ M	4,72	4,82	4,90	4,81	0,09
1x10⁻⁵ M	4,71	5,06	4,97	4,91	0,18

Controle de estradiol: 4,90 ± 0,02.

Tabela 21: Atividade anti-estrogênica na presença de estradiol – kaempferol-3,7-dira.

Efeito anti-proliferativo (K-3,7-dira + Estradiol – 10^{-10} M)					
	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Média	DE
1×10^{-9} M	4,36	4,65	4,82	4,61	0,23
1×10^{-8} M	4,41	4,70	4,87	4,66	0,23
1×10^{-7} M	4,46	4,67	4,70	4,61	0,13
1×10^{-6} M	4,49	4,68	4,77	4,65	0,14
1×10^{-5} M	4,71	4,71	4,72	4,64	0,13

Controle de estradiol: $4,71 \pm 0,09$.

Tabela 22: Inibição de aromatase na presença de testosterona – amentoflavona.

Efeito de inibição de aromatase (Amentoflavona + T 100nM)					
	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Média	DE
1×10^{-9} M	2,33	2,32	2,37	2,34	0,03
1×10^{-8} M	2,37	2,34	2,38	2,36	0,02
1×10^{-7} M	2,37	2,42	2,43	2,41	0,03
1×10^{-6} M	2,33	2,37	2,40	2,37	0,04
1×10^{-5} M	2,33	2,35	2,32	2,33	0,02

T = testosterona.; Controle de testosterona: $2,36 \pm 0,04$.

Tabela 23: Inibição de aromatase na presença de testosterona – ácido gálico.

Efeito de inibição de aromatase (Ácido gálico + T 100nM)					
	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Média	DE
1×10^{-9} M	2,06	2,10	2,20	2,15	0,05
1×10^{-8} M	2,24	2,18	2,30	2,21	0,03
1×10^{-7} M	2,15	2,20	2,25	2,20	0,02
1×10^{-6} M	2,25	2,33	2,38	2,24	0,04
1×10^{-5} M	2,20	2,35	2,38	2,21	0,01

T = testosterona; controle de testosterona: $2,33 \pm 0,03$.

Tabela 24: Inibição de aromatase na presença de testosterona – rutina.

Efeito anti-proliferativo (Rutina + T 100nM)					
	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Média	DE
1×10^{-9} M	2,11	2,15	2,20	2,12	0,07
1×10^{-8} M	2,21	2,18	2,23	2,24	0,06
1×10^{-7} M	2,19	2,20	2,22	2,20	0,05
1×10^{-6} M	2,25	2,28	2,20	2,32	0,07
1×10^{-5} M	2,22	2,22	2,30	2,31	0,10

T = testosterona; controle de testosterona: $2,42 \pm 0,10$.

Tabela 25: Inibição de aromatase na presença de testosterona – kaempferol-3,7-dira.

Efeito anti-proliferativo (Kaempferol3,7-dira + T 100nM)					
	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Média	DE
1×10^{-9} M	2,11	2,18	2,22	2,17	0,06
1×10^{-8} M	2,18	2,20	2,23	2,20	0,03
1×10^{-7} M	2,13	2,18	2,20	2,17	0,04
1×10^{-6} M	2,25	2,33	2,40	2,32	0,07
1×10^{-5} M	2,17	2,28	2,32	2,26	0,08

T = testosterona; controle de testosterona: $2,39 \pm 0,09$.

Tabela 26: Resumo dos resultados de atividade anti-estrogênica e inibição de aromatase obtidos com o método e-screen.

Substância	Concentração	Anti-estrogênico	Inibidor de aromatase
Amentoflavona	10 μ M	Não	Não
Rutina	10 μ M	Não	Não
Ácido gálico	10 μ M	Não	Não
K-3,7-dira	10 μ M	Não	Não

5.3. Avaliação da atividade citotóxica

É indiscutível a importância epidemiológica das neoplasias, patologia responsável por grande parte dos óbitos no Brasil e em todo o mundo. Apesar do sucesso em alguns casos, ainda não foi encontrado um tratamento que fosse simultaneamente eficaz e de baixa toxicidade. É possível que esse tipo de tratamento possa ser encontrado em uma molécula natural (ARAÚJO et al., 2007). Portanto, continuam em expansão as linhas de pesquisa para novos compostos anti-neoplásicos e sua avaliação em vários sistemas tumorais e cultura de células, objetivando selecionar compostos mais efetivos (HUSSAR, 2000 a,b; ASLANI et al., 2000).

Existem muitos estudos que descrevem a utilização de plantas ricas em alcalóides, flavonóides e outras substâncias, as quais são utilizadas popularmente para diversas patologias, inclusive, para o câncer (WENIGER et al., 2001). É justamente o caso de *I. suffruticosa*, cujos extratos aquosos já foram avaliados quanto à atividade tóxica em células tumorais (VIEIRA et al., 2006). Muitos alcalóides apresentaram efeitos mutagênicos através do teste de Ames, citotoxicidade em culturas de células mamárias e pulmonares, além da inibição do crescimento e mitose de células animais. A atividade desses alcalóides em células tem sido atribuída à capacidade de intercalação quando interagem com o DNA. Existem estudos que avaliam a citotoxicidade dos alcalóides em células cancerosas (ALVES et al., 2007).

As substâncias avaliadas quanto à atividade citotóxica pela técnica de sulforodamina-B foram inicialmente dissolvidas em DMSO (solução estoque) e posteriormente diluídas em meio de cultura para a obtenção das concentrações de trabalho.

O solvente etanol absoluto também foi considerado como “opcional” para a solubilização das substâncias. A concentração de DMSO esteve de acordo com a curva previamente elaborada para a avaliação da toxicidade desse solvente em células MCF7 clone ATCC, não ultrapassando 1% do volume final/cavidade (figura 19). Os resultados

foram obtidos com 3 (três) replicatas e 3 (três) experimentos independentes. Os dados das análises estatísticas realizadas com todas as substâncias puras avaliadas estão nos anexos V, VI e VII desse trabalho.

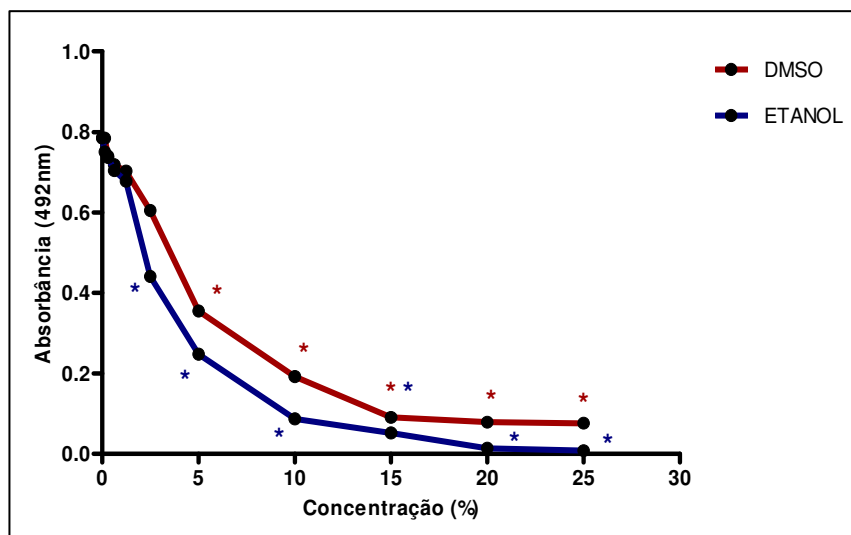


Figura 19: Viabilidade celular na presença de solventes.

Foram utilizadas suspensões de células MCF7 (concentração final nas microplacas = 5×10^5 células/cavidade). Após a incubação de 24 horas na presença de diferentes concentrações dos solventes, foi utilizada a técnica colorimétrica de sulforamina-B para a determinação da viabilidade celular. Células na presença de solvente e meio (DMEM) foram utilizadas como controle negativo, equivalendo a 100% de viabilidade celular. Cada ponto e barra representa a média \pm desvio padrão de 6 replicatas em 3 experimentos independentes. A estatística foi realizada através da análise de variância (ANOVA), utilizando o pós-teste de Dunnett. * $p < 0,05$ quando comparados ao controle negativo.

De acordo com os resultados obtidos com células MCF7, a indirubina isolada não demonstrou efeitos tóxicos nas concentrações avaliadas (figura 20), apresentando um IC50 médio de 714,45 $\mu\text{g/mL}$ (24 horas), 489,28 $\mu\text{g/mL}$ (48 horas) e 452,15 $\mu\text{g/mL}$ (72 horas). Pelos valores de IC50 obtidos, é possível perceber que o potencial tóxico está relacionado com o tempo de exposição celular à substância. Esse resultado nos permite sugerir que a utilização de indirubina em doses consecutivas pode induzir a morte celular por mecanismos diversos.

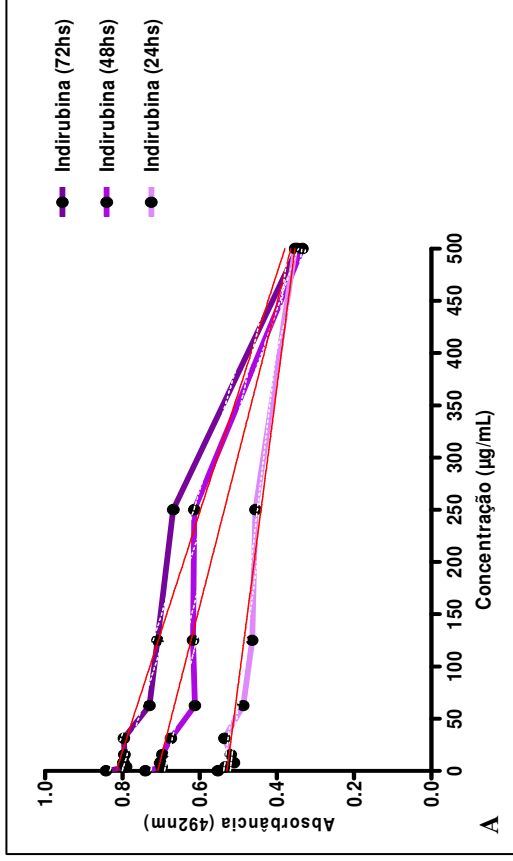
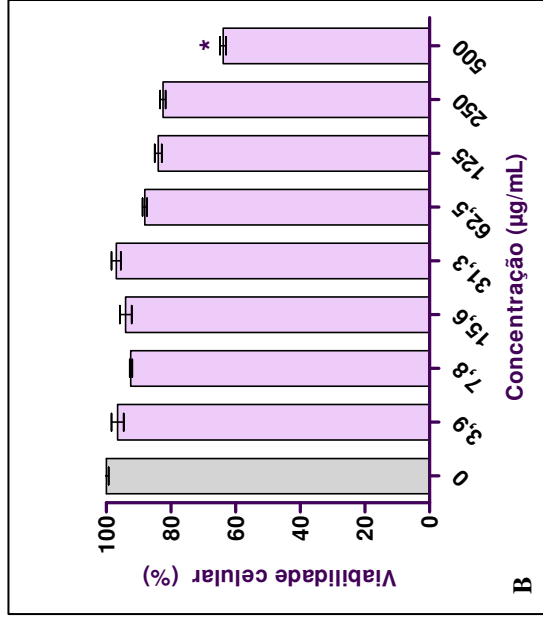
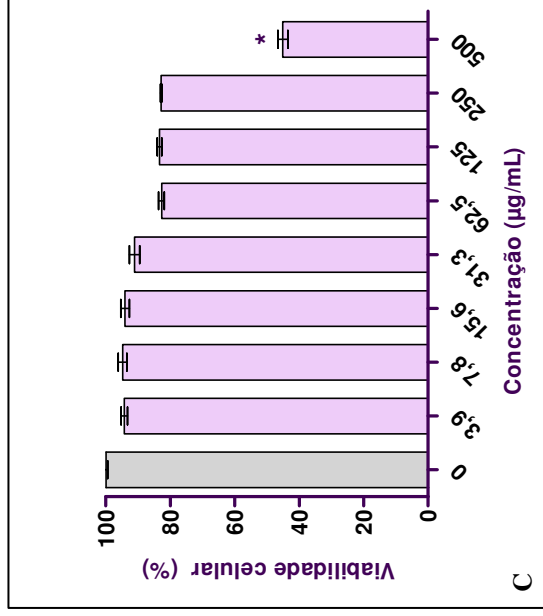


Figura 20: Viabilidade celular da presença de indirubina.

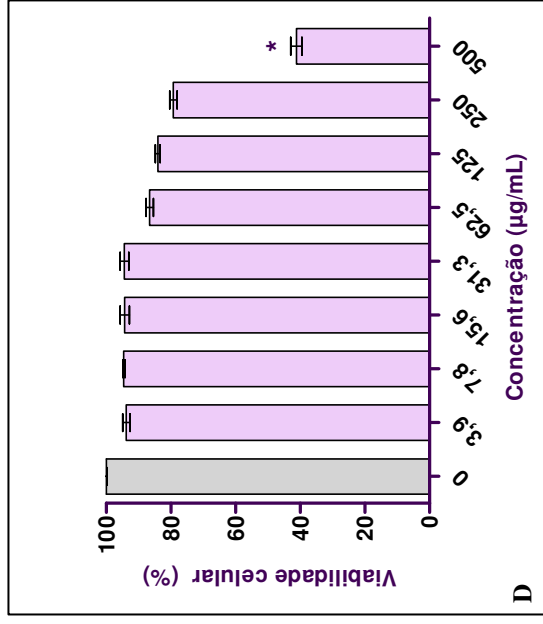
Foram utilizadas suspensões de células MCF7 (concentração final nas microplacas = 5×10^5 células/cavidade). Após a incubação de 24, 48 e 72h na presença de diferentes concentrações de indirubina, foi utilizada a técnica colorimétrica de sulforodamina-B para a determinação da viabilidade celular. Células na presença de solvente e meio (DMEM) foram utilizadas como controle negativo, equivalentes a 100% de viabilidade celular. Cada ponto e barra representa a média \pm desvio padrão de 6 replicatas em 3 experimentos independentes. A estatística foi realizada através da análise de variância (ANOVA), utilizando o pós-teste de Dunnett. * $p < 0,05$ quando comparados ao controle negativo. Os valores de IC50 foram calculados através da análise de regressão linear.



Viabilidade celular (24 horas).
* $p < 0,05$.



Viabilidade celular (48 horas).
* $p < 0,05$.



Viabilidade celular (72 horas).
* $p < 0,05$.

Em revisão à literatura, podemos verificar que já existem estudos *in vitro* (MEIJER et al., 2007) e *in vivo* (CHRISTINA et al., 2003) relacionados à atividade antitumoral da indirubina, principalmente na leucemia (STERITI, 2002). O mecanismo de ação da indirubina tem sido relacionado à inibição de proteínas quinase (induzindo a morte celular), além da caspase dependente e independente (MEIJER et al, 2007). Já é documentando que alterações na expressão dessas proteínas interferem na fase G1 do ciclo celular (BUOLAMWINI, 2000; MARKO et al., 2001). Segundo estudos realizados por Vieira (2007), extratos aquosos de *I. suffruticosa*, planta rica em indirubina e índigo, não apresentaram toxicidade em células tumorais Hep-2 (concentrações que variaram entre 6,25 e 50 µg/mL), embora tenham reduzido, *in vivo*, o desenvolvimento de sarcoma 180 em camundongos (dose diária de 50 mg/kg, via intraperitoneal, por 7 dias consecutivos).

Existem relatos que descrevem testes realizados com derivados glicosilados de indirubina em algumas linhagens celulares, inclusive MCF7 (LIBNOW et al., 2008). Tabelas elaboradas nesses trabalhos descrevem que os valores de IC50 das substâncias avaliadas se apresentaram entre 168 e 6489 µg/mL, coincidindo, de certa forma, com os resultados obtidos com a indirubina, embora seja visível a baixa solubilidade dessa molécula em meio aquoso (altas concentrações). Provavelmente, a adição de moléculas de açúcar aumente a solubilidade dessas moléculas, sendo possível avaliar concentrações superiores a 500 µg/mL. O maior problema enfrentado no trabalho com essas moléculas não glicosiladas (indirubina e índigo) foi a precipitação das mesmas, prejudicando os experimentos em concentrações superiores a 500 µg/mL, embora a técnica de sulforodamina-B possua uma etapa de lavagem com PBS e retirada de possíveis resíduos.

O estudo dos mecanismos de ação da indirubina, assim como o direcionamento para linhagens tumorais mais sensíveis, deve ser reforçado com o objetivo de assegurar a eficácia e segurança na utilização de plantas que contenham essa substância no tratamento, por exemplo, do câncer (LEITE et al., 2006).

Os resultados da exposição de células MCF7 ao índigo em 24, 48 e 72 horas não evidenciaram seu potencial citotóxico (figura 21). Mesmo apresentando um efeito gradativamente tóxico com o tempo de exposição celular, essa molécula não foi citotóxica e os valores de IC50 para 24, 48 e 72 horas foram, respectivamente: $1572,98 \pm 11,99 \mu\text{g/mL}$; $1338,38 \pm 22,72 \mu\text{g/mL}$; $917,67 \pm 2,50 \mu\text{g/mL}$.

Estudos realizados com o mesoíndigo (um derivado da indirubina) em linhagem leucêmica de ratos revelaram que essa molécula foi capaz de inibir potencialmente a síntese de DNA (JI et al., 1991). Foi verificado que a molécula também era capaz de modificar o funcionamento dos microtúbulos, bloquear a passagem celular da fase G2 + M para a fase G1 durante o ciclo celular, além de modular o gene c-Myb, importante no prosseguimento da fase S (LIU et al., 1996). Na literatura, porém, não existem relatos da aplicação direta do índigo em culturas de células tumorais humanas.

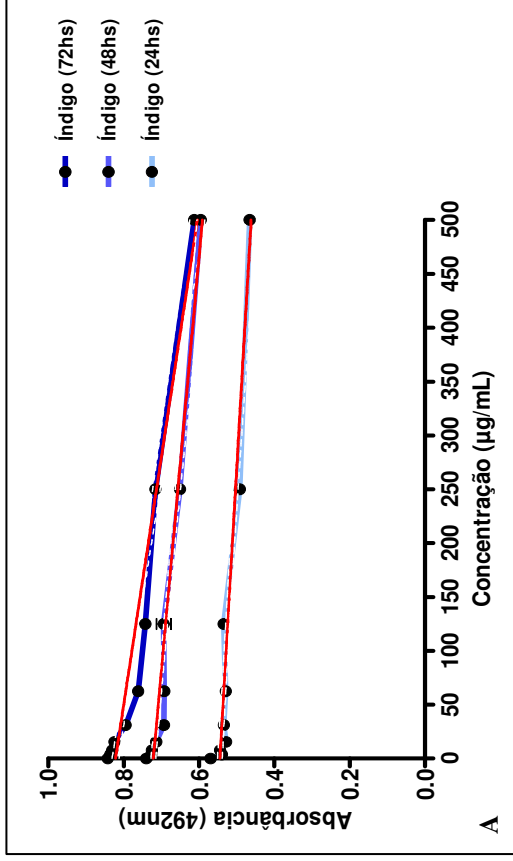
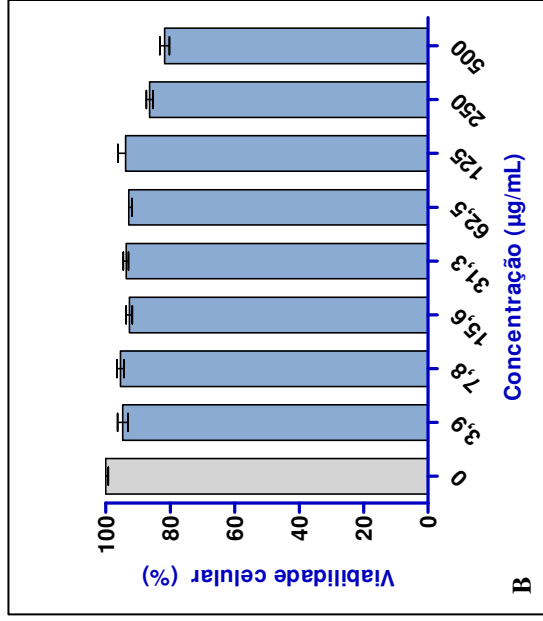
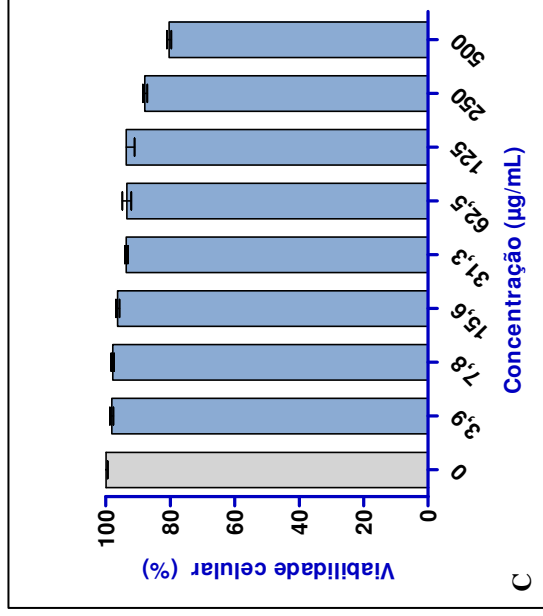


Figura 21: Viabilidade celular na presença de índigo.

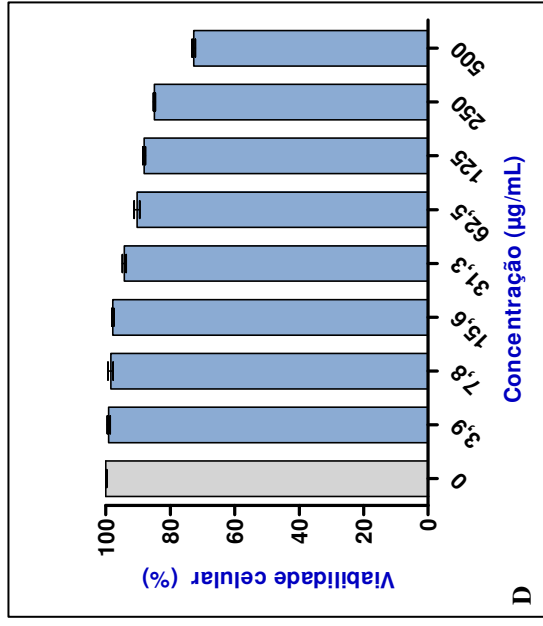
Foram utilizadas suspensões de células MCF7 (concentração final nas microplacas = 5×10^5 células/cavidade). Após a incubação de 24, 48 e 72h na presença de diferentes concentrações de índigo, foi utilizada a técnica colorimétrica de sulforodamina-B para a determinação da viabilidade celular. Células na presença de solvente e meio (DMEM) foram utilizadas como controle negativo, equivalendo a 100% de viabilidade celular. Cada ponto e barra representa a média \pm desvio padrão de 6 replicatas em 3 experimentos independentes. A estatística foi realizada através da análise de variância (ANOVA), utilizando o pós-teste de Dunnett. * $p < 0,05$ quando comparados ao controle negativo. Os valores de IC50 foram calculados através da análise de regressão linear.



Viabilidade celular (24 horas).
* $p < 0,05$.



Viabilidade celular (48 horas).
* $p < 0,05$.



Viabilidade celular (72 horas).
* $p < 0,05$.

A isatina apresentou efeito tóxico (figura 22), o qual aumentou discretamente com o tempo de exposição celular. Os valores de IC50 para 24, 48 e 72 horas foram, respectivamente, $52,32 \pm 0,82 \mu\text{g/mL}$; $49,02 \pm 0,62 \mu\text{g/mL}$; $41,44 \pm 0,92 \mu\text{g/mL}$.

Esses resultados estão dentro da faixa de concentrações entre 50 e 200 $\mu\text{g/mL}$, testadas no trabalho de Hou et al., 2008, no qual encontraram atividades promissoras da isatina como molécula candidata à atividade antitumoral. Segundo os estudos recentes de alguns pesquisadores chineses, a isatina, molécula precursora da biossíntese vegetal de indirubina, é candidata ao tratamento de tumores. Após a aplicação de isatina em cultura de células humanas de neuroblastoma (SH-SY5Y), puderam observar o aumento de caspase-3 ativada e indução de apoptose (HOU et al., 2008). Essa mesma característica foi comprovada por Vine et al. (2007), que avaliaram o potencial citotóxico não somente da isatina, mas de uma série de derivados sintéticos da mesma, em células humanas de linfoma (U937). Existem, também, relatos de estudos anteriores a estes, utilizando essas duas linhagens celulares e comprovando a atividade citotóxica de complexos de isatina com cobre (CERCHIARO et al, 2005).

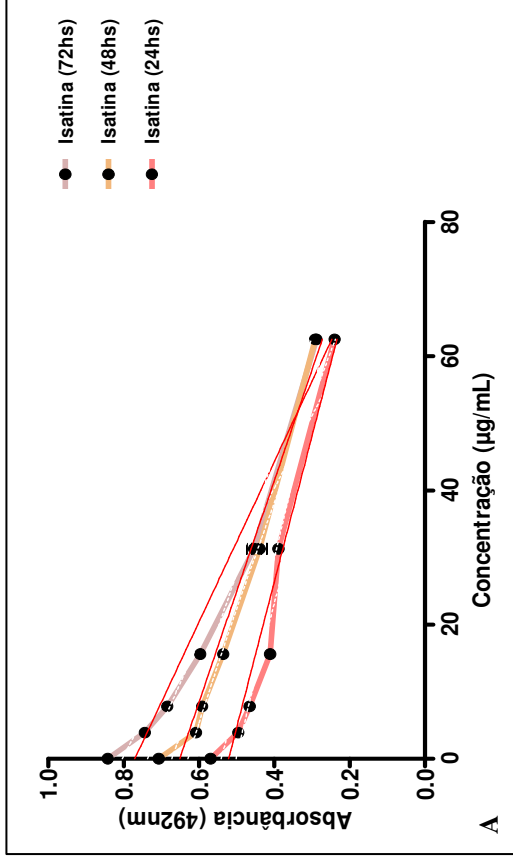
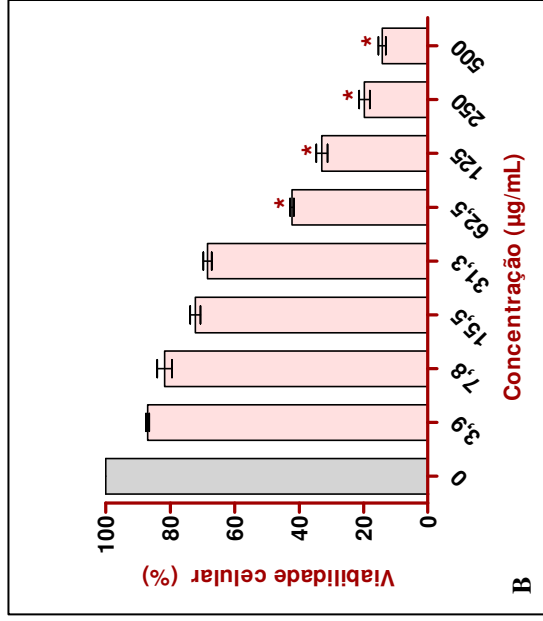
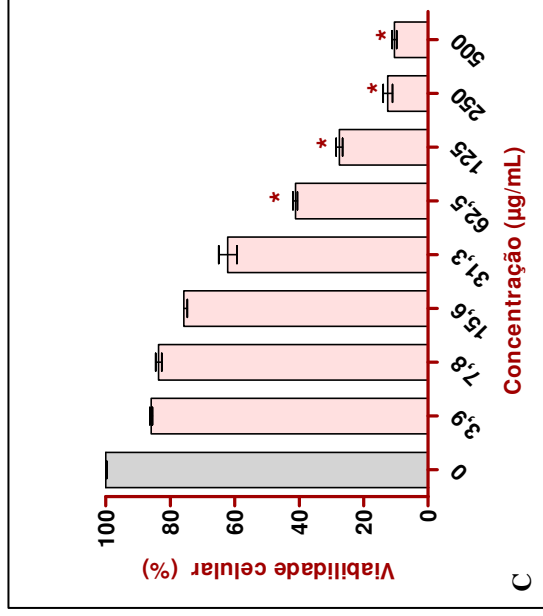


Figura 22: Viabilidade celular na presença de isatina.

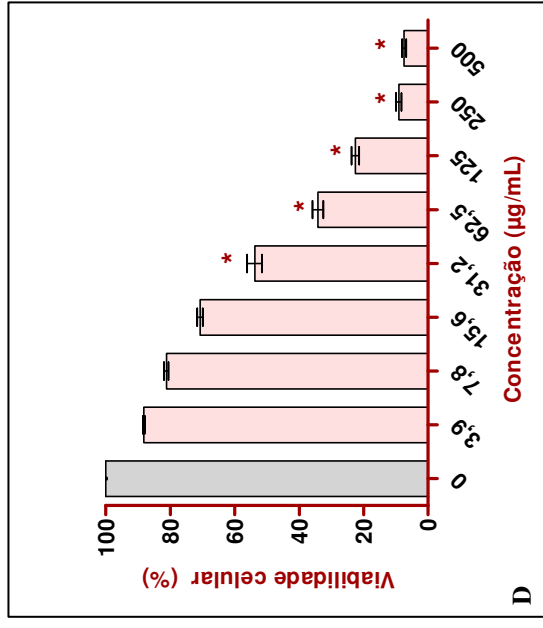
Foram utilizadas suspensões de células MCF7 (concentração final nas microplacas = 5×10^5 células/cavidade). Após a incubação de 24, 48 e 72h na presença de diferentes concentrações de isatina, foi utilizada a técnica colorimétrica de sulforodamina-B para a determinação da viabilidade celular. Células na presença de solvente e meio (DMEM) foram utilizadas como controle negativo, equivalendo a 100% de viabilidade celular. Cada ponto e barra representa a média \pm desvio padrão de 6 replicatas em 3 experimentos independentes. A estatística foi realizada através da análise de variância (ANOVA), utilizando o pós-teste de Dunnett. * $p < 0,05$ quando comparados ao controle negativo. Os valores de IC50 foram calculados através da análise de regressão linear.



Viabilidade celular (24 horas).
* $p < 0,05$.



Viabilidade celular (48 horas).
* $p < 0,05$.



Viabilidade celular (72 horas).
* $p < 0,05$.

Os ensaios de citotoxicidade também foram realizados com ácido gálico, ácido quínico, kaempferol-3,7-diraminosídeo, rutina e amentoflavona. No contexto desses experimentos, destacamos o ácido gálico como uma molécula citotóxica para a linhagem MCF7 (figura 23). Os valores de IC50 para 24, 48 e 72 horas foram, respectivamente, $67,59 \pm 0,85 \mu\text{g/mL}$; $62,61 \pm 0,98 \mu\text{g/mL}$; $60,25 \pm 1,61 \mu\text{g/mL}$.

O potencial citotóxico do ácido gálico em diversas linhagens tumorais já foi documentado. É uma substância fenólica que ocorre naturalmente nas plantas e possui forte atividade antioxidante, sendo capaz de inibir tumores em vários modelos de estudo do câncer (JAGAN et al., 2008; RAINA et al., 2008). Segundo estudos de Hwang et al. (2008), o ácido gálico apresentou atividade citotóxica, avaliada pela técnica de MTT, para a linhagem MCF7 exposta a diferentes concentrações de ácido gálico por 24 horas. Também foi evidenciada a indução da apoptose em células de leucemia polimielocítica (HL-60RG) (INOUE et al., 1994) e influência no ciclo celular de células de carcinoma de cólon humano (Caco2) (SALUCCI et al., 2002). Lopes (2008) avaliou o efeito citotóxico do ácido gálico em células tumorais de mama (LM2) e de pulmão (LPO7), verificando alta toxicidade para ambas as linhagens. Também Faried et al., (2007), isolaram ácido gálico de uma espécie vegetal chamada *Phaleria macrocarpa* (Scheff.), o qual inibiu de forma significativa a proliferação de várias linhagens e induziu a apoptose de células tumorais de esôfago, aumentando a expressão de proteínas relacionadas a esse processo. Segundo esses autores, o ácido gálico pode ser considerado uma molécula antitumoral bastante promissora. Além disso, é um componente dos taninos hidrolisáveis, muito comuns em diversas espécies vegetais (KIM et al., 2008). Segundo Tanimura et al. (2005), os taninos hidrolisáveis também possuem a capacidade de inibirem a ação invasiva de células tumorais via inibição de das matrizes metaloproteinases 2 e 9, relacionadas com o potencial metastático de muitas células tumorais. Yang et al. (2000) também relataram a indução de apoptose em células leucêmicas por taninos hidrolisáveis de *Eugenia lambos* L.

Frente a estas evidências científicas, ressaltamos a importância dos resultados obtidos sobre a ação tóxica do ácido gálico para células MCF7 clone ATCC, uma vez que o câncer de mama humano é uma patologia incidente no mundo todo e, devido ao seu grau de mortalidade, merece destaque na busca de novos recursos terapêuticos.

O ácido quínico não apresentou atividade citotóxica nessa linhagem, ou seja, os valores de IC50% foram obtidos por cálculos, utilizando a equação da reta de regressão linear (figura 24). Os valores de IC50 para 24, 48 e 72 horas foram, respectivamente, $839,97 \pm 5,67 \mu\text{g/mL}$; $828,10 \pm 2,62 \mu\text{g/mL}$; $609,01 \pm 1,53 \mu\text{g/mL}$. Não existem dados na literatura sobre estudos da atividade do ácido quínico sobre linhagens tumorais.

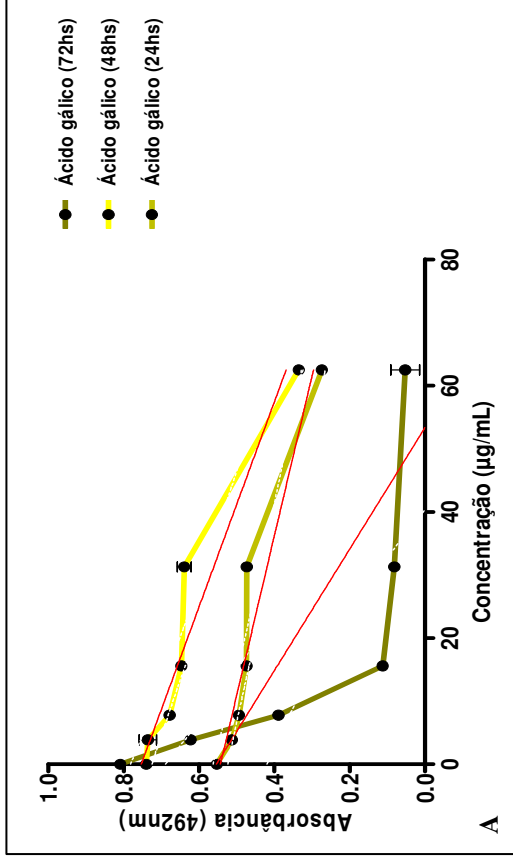
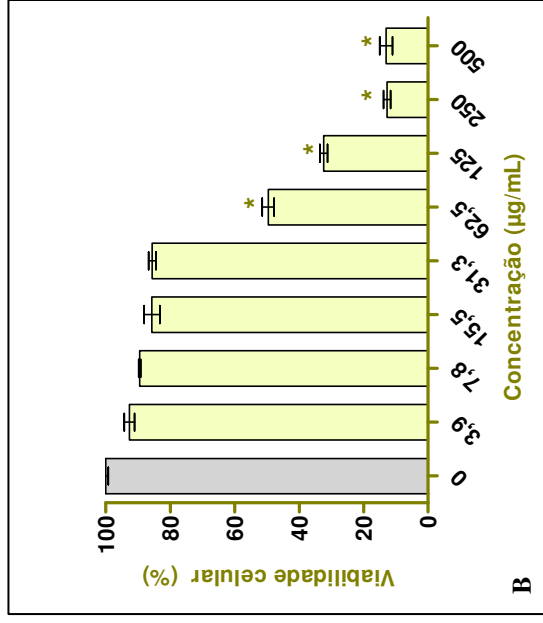
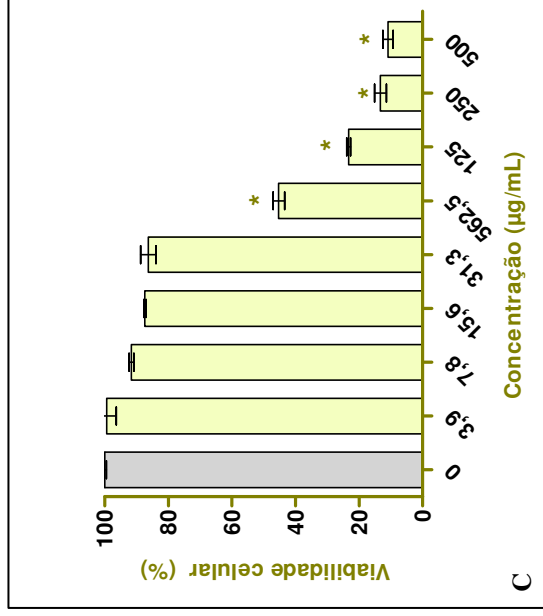


Figura 23: Viabilidade celular na presença de ácido gálico.

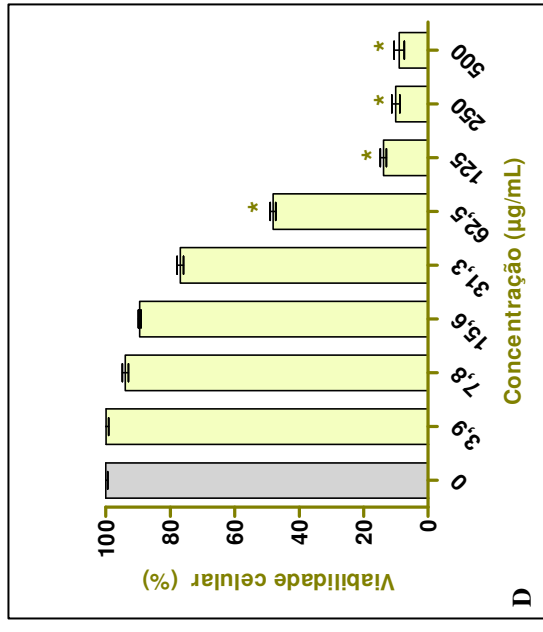
Foram utilizadas suspensões de células MCF7 (concentração final nas microplacas = 5×10^5 células/cavidade). Após a incubação de 24, 48 e 72h na presença de diferentes concentrações de ácido gálico, foi utilizada a técnica colorimétrica de sulforodamina-B para a determinação da viabilidade celular. Células na presença de solvente e meio (DMEM) foram utilizadas como controle negativo, equivalendo a 100% de viabilidade celular. Cada ponto e barra representa a média \pm desvio padrão de 6 replicatas em 3 experimentos independentes. A estatística foi realizada através da análise de variância (ANOVA), utilizando o pós-teste de Dunnett. * $p < 0,05$ quando comparados ao controle negativo. Os valores de IC50 foram calculados através da análise de regressão linear.



Viabilidade celular (24 horas).
* $p < 0,05$.



Viabilidade celular (48 horas).
* $p < 0,05$.



Viabilidade celular (72 horas).
* $p < 0,05$.

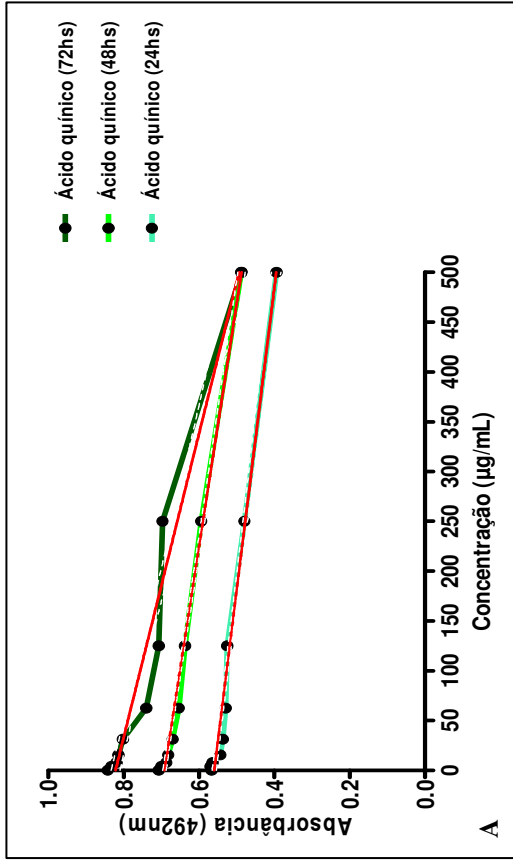
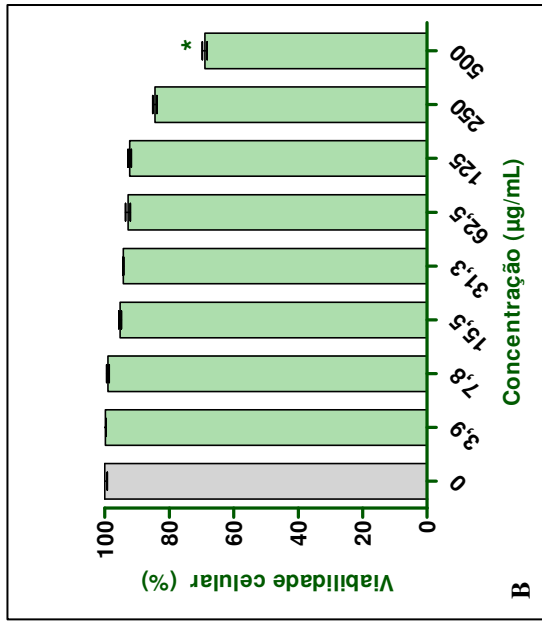
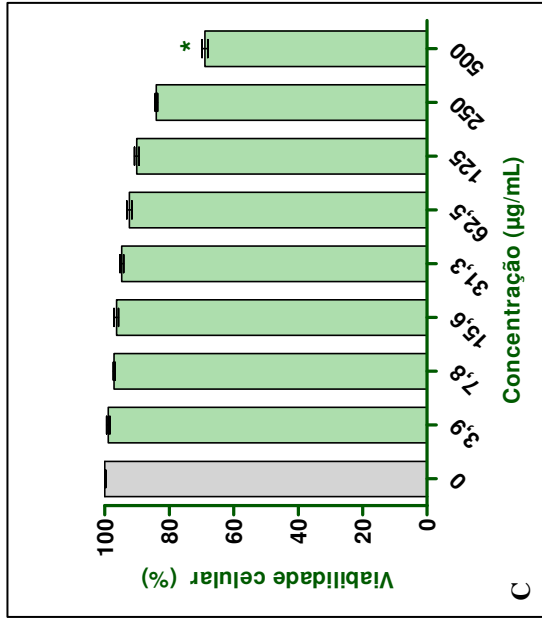


Figura 24: Viabilidade celular na presença de ácido quínico.

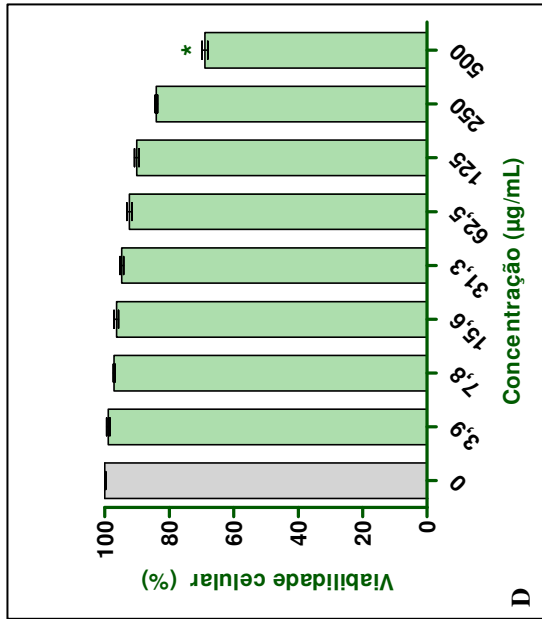
Foram utilizadas suspensões de células MCF7 (concentração final nas microplacas = 5×10^5 células/cavidade). Após a incubação de 24, 48 e 72h na presença de diferentes concentrações de ácido quínico, foi utilizada a técnica colorimétrica de sulforodamina-B para a determinação da viabilidade celular. Células na presença de solvente e meio (DMEM) foram utilizadas como controle negativo, equivalendo a 100% de viabilidade celular. Cada ponto e barra representa a média \pm desvio padrão de 6 replicatas em 3 experimentos independentes. A estatística foi realizada através da análise de variância (ANOVA), utilizando o pós-teste de Dunnett. * $p < 0,05$ quando comparados ao controle negativo. Os valores de IC50 foram calculados através da análise de regressão linear.



Viabilidade celular (24 horas).
* $p < 0,05$.



Viabilidade celular (48 horas).
* $p < 0,05$.



Viabilidade celular (72 horas).
* $p < 0,05$.

A amentoflavona também não se apresentou como um flavonóide de alta toxicidade nessa linhagem tumoral de acordo com a técnica utilizada nesse trabalho (figura 25). Os valores de IC50 para 24, 48 e 72 horas foram, respectivamente, $476,56 \pm 5,09 \mu\text{g/mL}$; $456,47 \pm 6,45 \mu\text{g/mL}$; $328,60 \pm 3,95 \mu\text{g/mL}$.

Existem alguns relatos na literatura sobre o potencial citotóxico da amentoflavona sobre algumas linhagens tumorais. Silva et al. (1994), avaliaram o potencial citotóxico da amentoflavona e outros biflavonóides em diversas linhagens celulares. Segundo esses autores, foi possível detectar essa atividade apenas para 2 linhagens avaliadas: HT-1080 (fibrosarcoma), com IC50 $9,2 \mu\text{g/mL}$ e Lu1 (pulmão), com IC50% $18,2 \mu\text{g/mL}$. Para as demais linhagens, a molécula não foi tóxica nas concentrações testadas. Existe também um estudo sobre a inibição da proliferação de células de carcinoma de Ehrlich *in vitro*, em um tratamento por 48 horas com amentoflavona (IC50 $23,9 \text{ mM}$), sendo que estas células também sofreram fragmentação do DNA (GRYNBERG, 1999). Estudos recentes de Lee et al. (2009) demonstraram que a amentoflavona induz a apoptose dose-dependente de células tumorais de mama humana (SK-BR-3) pelo bloqueio da síntese de ácidos graxos. Apesar dessas informações, não foi possível evidenciar esses efeitos *in vitro*, utilizando para isso a linhagem MCF7 (ATCC) e a técnica de sulforodamina.

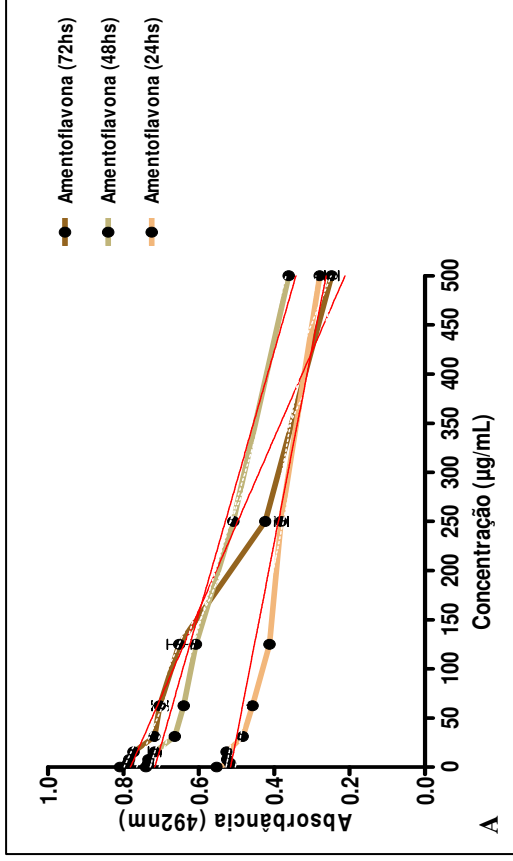
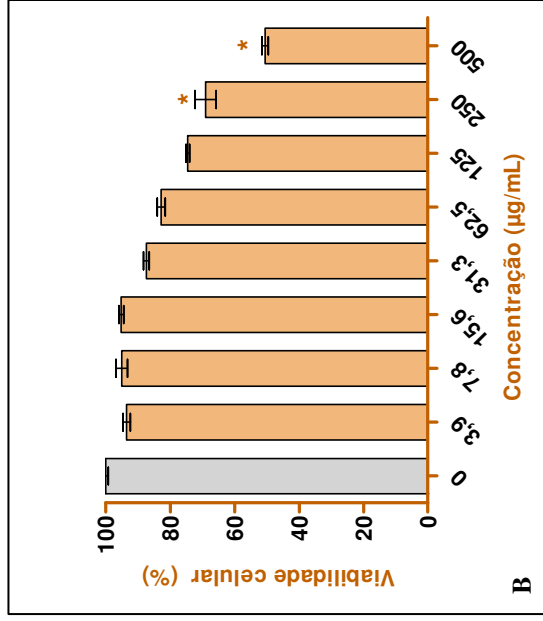
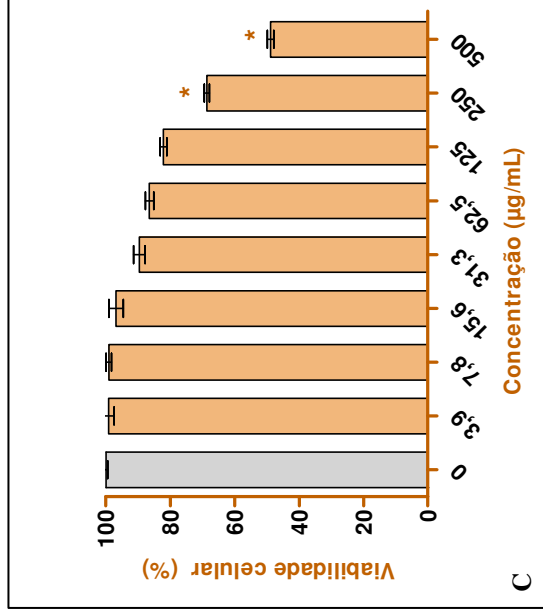


Figura 25: Viabilidade celular na presença de amentoflavona.

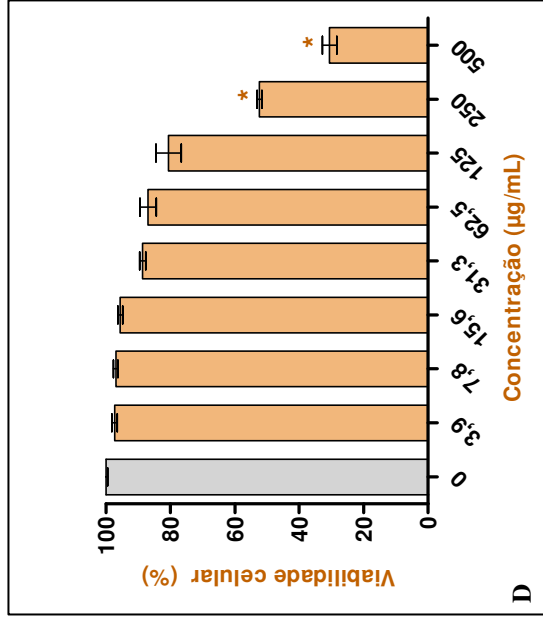
Foram utilizadas suspensões de células MCF7 (concentração final nas microplacas = 5×10^5 células/cavidade). Após a incubação de 24, 48 e 72h na presença de diferentes concentrações de amentoflavona, foi utilizada a técnica colorimétrica de sulforodamina-B para a determinação da viabilidade celular. Células na presença de solvente e meio (DMEM) foram utilizadas como controle negativo, equivalendo a 100% de viabilidade celular. Cada ponto e barra representa a média \pm desvio padrão de 6 replicatas em 3 experimentos independentes. A estatística foi realizada através da análise de variância (ANOVA), utilizando o pós-teste de Dunnett. $* p < 0,05$ quando comparados ao controle negativo. Os valores de IC50 foram calculados através da análise de regressão linear.



Viabilidade celular (24 horas).
* $p < 0,05$.



Viabilidade celular (48 horas).
* $p < 0,05$.



Viabilidade celular (72 horas).
* $p < 0,05$.

A rutina também não apresentou potencial citotóxico nas concentrações utilizadas (figura 26). Os valores de IC50 para 24, 48 e 72 horas foram, respectivamente, $588,91 \pm 4,62 \mu\text{g/mL}$; $568,24 \pm 2,26 \mu\text{g/mL}$; $564,67 \pm 15,12 \mu\text{g/mL}$. De acordo com os estudos de Soares et al. (2006), que avaliaram a exposição de células McCoy, também não houve evidência da citotoxicidade da rutina, sendo que o IC50% foi considerado como maior que $500 \mu\text{g/mL}$.

Os valores de IC50 do kaempferol-3,7-diraminosídeo em 24, 48 e 72 horas foram, respectivamente, $532,27 \pm 3,54 \mu\text{g/mL}$; $441,90 \pm 10,26 \mu\text{g/mL}$; $451 \pm 3,46 \mu\text{g/mL}$. A figura 27 demonstra as curvas dose-resposta dessa molécula com 24, 48 e 72 horas de exposição celular. Existem evidências sobre o potencial citotóxico do kaempferol na forma aglicona, dependendo do tipo de tecido e concentração. Zhang et al. (2008), descobriram que o kaempferol inibe a proliferação de células tumorais pancreáticas pela indução de apoptose e influência em outros processos celulares relacionados aos tumores e que esse potencial é reduzido a medida que essa mesma molécula é substituída com açúcares em diferentes posições (em especial, a posição do C3). Estudos de Susanti et al. (2007), evidenciaram a citotoxicidade do kaempferol em células MCF7. Porém, quando moléculas de kaempferol conjugadas com açúcares (na posição do C3) foram testadas, verificaram uma redução significativa do potencial citotóxico. Existe também um estudo da atividade citotóxica do kaempferol conjugado com açúcar na posição 7 em linhagens tumorais (LI et al., 2007). Embora eles considerem uma razoável citotoxicidade dessa molécula para algumas células (por exemplo, HeLa), é importante destacar que a mesma foi consideravelmente mais reduzida do que aquela apresentada pela aglicona. Os resultados obtidos *in vitro* com a molécula conjugada com açúcares nas duas posições mencionadas (3 e 7) não evidenciaram seu efeito citotóxico. É possível sugerir, justamente, que a redução dessa atividade esteja relacionada a esse fato.

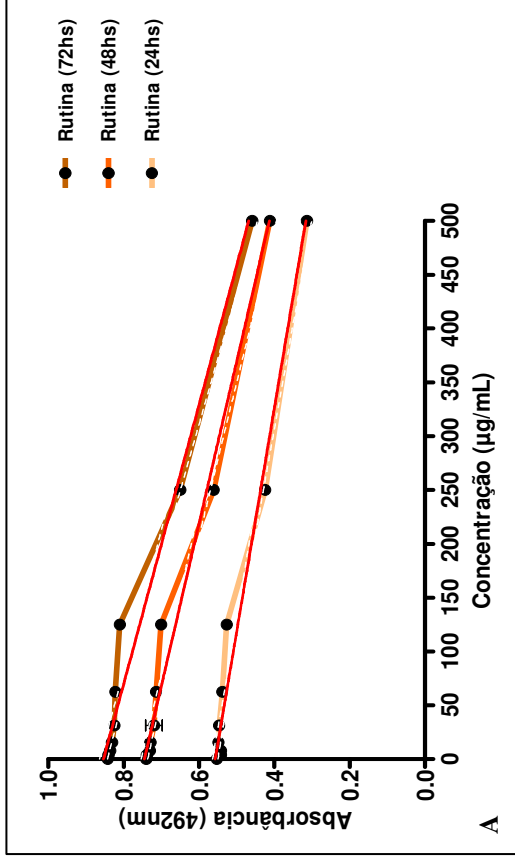
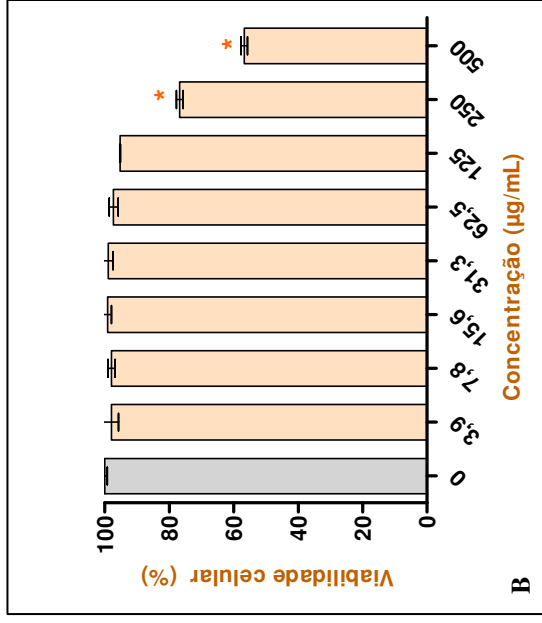
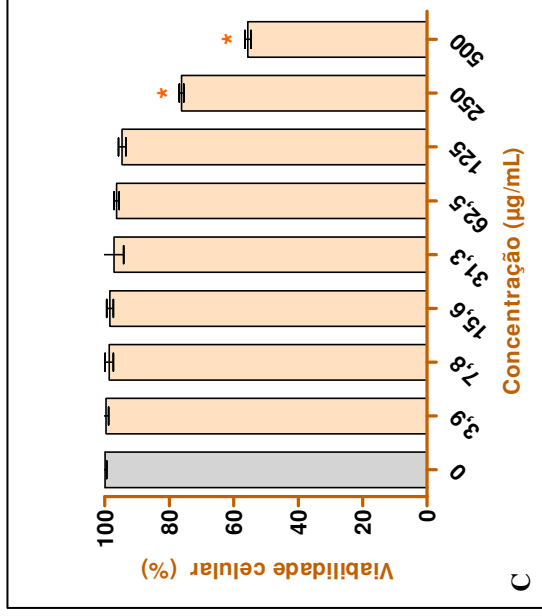


Figura 26: Viabilidade celular na presença de rutina.

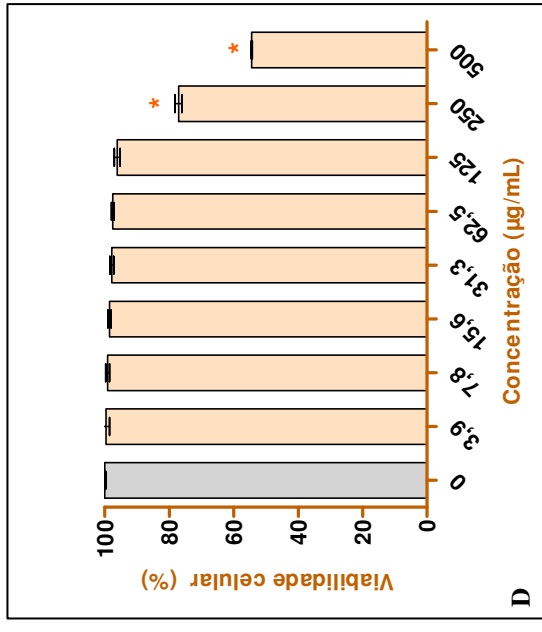
Foram utilizadas suspensões de células MCF7 (concentração final nas microplacas = 5×10^5 células/cavidade). Após a incubação de 24, 48 e 72h na presença de diferentes concentrações de rutina, foi utilizada a técnica colorimétrica de sulforodamina-B para a determinação da viabilidade celular. Células na presença de solvente e meio (DMEM) foram utilizadas como controle negativo, equivalendo a 100% de viabilidade celular. Cada ponto e barra representa a média \pm desvio padrão de 6 replicatas em 3 experimentos independentes. A estatística foi realizada através da análise de variância (ANOVA), utilizando o pós-teste de Dunnett. * $p < 0,05$ quando comparados ao controle negativo. Os valores de IC50 foram calculados através da análise de regressão linear.



Viabilidade celular (24 horas).
* $p < 0,05$.



Viabilidade celular (48 horas).
* $p < 0,05$.



Viabilidade celular (72 horas).
* $p < 0,05$.

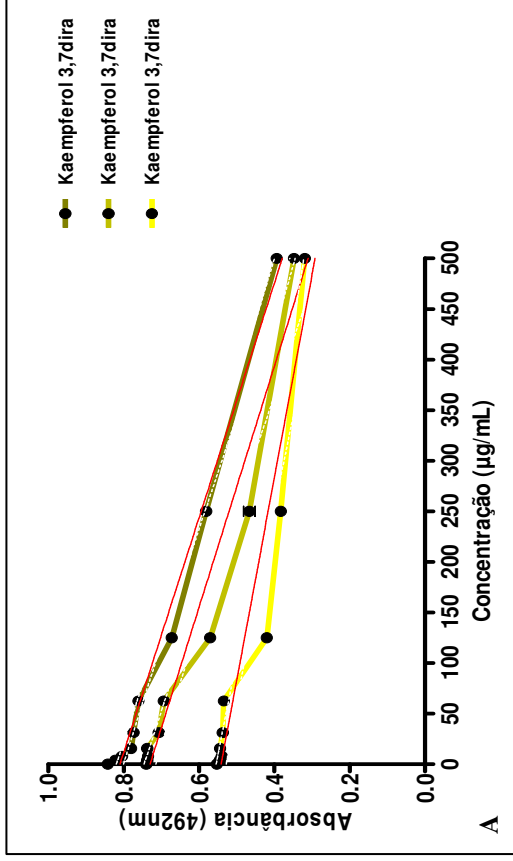
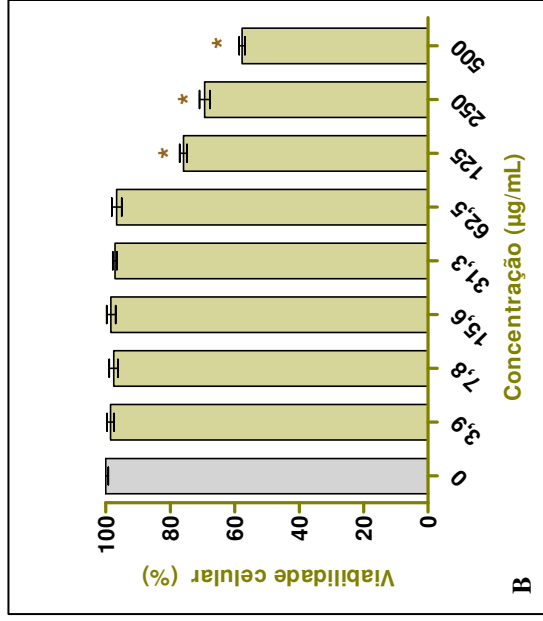
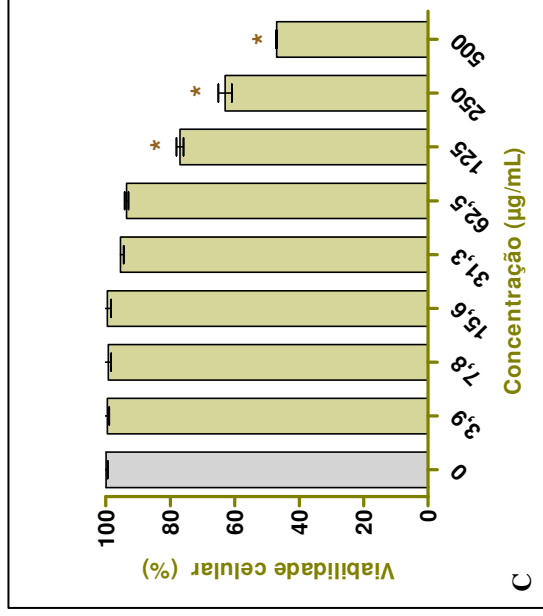


Figura 27: Viabilidade celular na presença de kaempferol-3,7-dira.

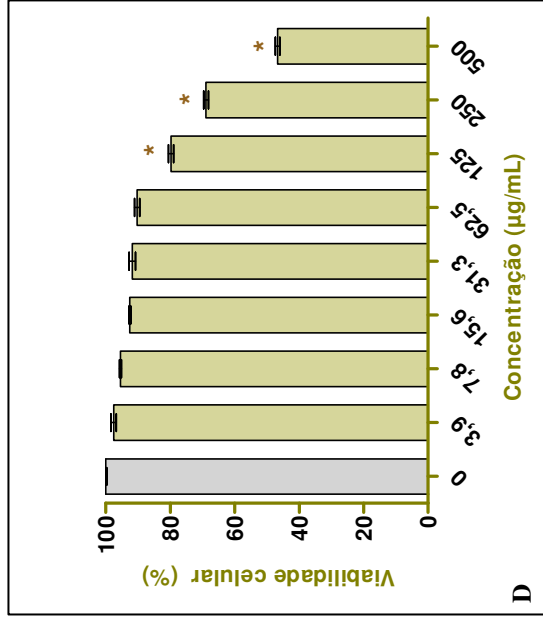
Foram utilizadas suspensões de células MCF7 (concentração final nas microplacas = 5×10^5 células/cavidade). Após a incubação de 24, 48 e 72h na presença de diferentes concentrações de kaempferol-3,7-dira, foi utilizada a técnica colorimétrica de sulforodamina-B para a determinação da viabilidade celular. Células na presença de solvente e meio (DMEM) foram utilizadas como controle negativo, equivalendo a 100% de viabilidade celular. Cada ponto e barra representa a média \pm desvio padrão de 6 replicatas em 3 experimentos independentes. A estatística foi realizada através da análise de variância (ANOVA), utilizando o pós-teste de Dunnett. $* p < 0,05$ quando comparados ao controle negativo. Os valores de IC50 foram calculados através da análise de regressão linear.



Viabilidade celular (24 horas).
* $p < 0,05$.



Viabilidade celular (48 horas).
* $p < 0,05$.



Viabilidade celular (72 horas).
* $p < 0,05$.

Em resumo, a tabela 27 apresenta os valores de IC50 das 8 substâncias avaliadas nesse trabalho quanto ao potencial citotóxico em células MCF7, utilizando a técnica de sulforodamina-B em 3 experimentos independentes (24, 48 e 72 horas). Destacamos, entre as substâncias avaliadas, o significativo potencial citotóxico da isatina e do ácido gálico. Os resultados obtidos, de certa forma, não apenas confirmaram alguns dados da literatura, mas acrescentaram informações relevantes, de forma específica, para as células MCF7. A técnica de sulforodamina se mostrou mais eficiente e confiável, mesmo para a análise de substâncias substituídas com açúcares, situação muitas vezes comprometida com a utilização da técnica de MTT (sal de tetrazólio).

Mais uma vez enfatizamos que os estudos *in vitro* são insuficientes para elucidar a complexa interação dessas substâncias com o organismo e a utilização desses dados na preparação de um medicamento. Sem dúvida, outros estudos adicionais (*in vitro* e *in vivo*) são fundamentais para o esclarecimento dos resultados obtidos.

Tabela 27: Índice citotóxico (IC50) das moléculas isoladas das espécies de *Byrsonima* e *Indigofera* pela técnica de sulforodamina-B.

Substâncias	72 horas			48 horas			24 horas					
	Exp 1	Exp 2	Exp 3	Média ± DP	Exp 1	Exp 2	Exp 3	Média ± DP	Exp 1	Exp 2	Exp 3	Média ± DP
Isatina	41,79	40,39	42,13	41,44 ± 0,92	49,23	48,33	49,51	49,02 ± 0,62	51,49	52,37	53,12	52,32 ± 0,82
Índigo	913,46	918,38	915,17	915,67 ± 2,50	1354,00	1312,32	1348,82	1338,38 ± 22,7	1574,48	1560,32	1584,15	1572,98 ± 11,9
Amentoflavona	324,11	331,52	330,18	328,60 ± 3,95	463,37	450,58	455,47	456,56 ± 6,45	474,72	482,32	472,64	476,56 ± 5,09
Kaempferol 3,7diira	451,76	454,7	447,8	451,42 ± 3,46	430,08	447,13	448,5	441,90 ± 10,26	532,28	528,72	535,80	451,42 ± 3,46
Rutina	563,84	580,33	550,14	564,77 ± 15,72	568,87	570,12	565,74	568,24 ± 2,26	583,79	590,15	592,78	564,77 ± 15,12
Ácido gálico	61,51	60,81	58,44	60,25 ± 1,61	62,18	63,74	61,92	62,61 ± 0,98	67,36	68,54	66,89	60,25 ± 1,61
Ácido quínico	609,36	610,33	607,33	609,01 ± 1,53	825,17	830,24	828,88	828,10 ± 2,62	833,44	843,62	842,84	609,01 ± 1,33
Indirubina	450,48	454,65	451,33	452,15 ± 2,20	490,67	484,82	492,34	489,28 ± 3,95	714,06	713,3	715,82	452,15 ± 2,20

5.4. Avaliação da atividade anti-*Leishmania*

A leishmaniose é uma infecção causada por protozoários do gênero *Leishmania*. Essa doença é endêmica em países da América, Ásia e África tropical, com uma estimativa de 1 a 2 milhões de casos ao ano em cerca de 90 países (COSTA et al., 2009). Além de possuir um caráter debilitante, pode apresentar-se na forma visceral, cutânea ou mucocutânea (MUSONDA et al., 2009), sendo, inclusive, fatal quando não tratada (COSTA et al., 2009). A quimioterapia para essa enfermidade parasitária é geralmente prejudicada por vários motivos como, por exemplo, a emergência de cepas droga-resistentes, significativa toxicidade, eficácia variável, escassez de estudos sobre a biodisponibilidade via oral, efeitos adversos e o alto custo dos agentes terapêuticos existentes (SRINIVAS et al., 2009). Com todos esses motivos, é evidente a necessidade de se investigar e descobrir novos fármacos seguros e eficazes para o tratamento dessa doença (COGHI et al., 2008).

Nesse contexto, tem aumentado o interesse em se estudar os remédios tradicionais para o desenvolvimento de novos quimioterápicos com melhor atividade e menos efeitos tóxicos (ARAÚJO et al., 1998). O uso da informação etnofarmacológica favorece a seleção de plantas a serem investigadas e os produtos isolados das mesmas podem transformar-se em protótipos para o estudo estrutura química-mecanismo de ação antiparasitária. A moderna terapia derivada de plantas medicinais promete uma prática adequada para o desenvolvimento de drogas mais eficazes e baratas para o tratamento de leishmanioses (IWU et al., 1994).

Com base nos resultados obtidos nos ensaios de citotoxicidade, elegemos apenas duas moléculas a serem avaliadas contra *L. amazonensis*: ácido gálico e isatina. Os dados referentes à análise estatística das absorbâncias obtidas nos ensaios com MTT estão no anexo IX e X.

A tabela 28 resume a análise estatística dos resultados obtidos com isatina e ácido gálico. A tabela 29 demonstra os resultados obtidos pelo método contagem manual de

parasitas em câmara de Neubauer. O objetivo em se realizar as duas técnicas foi verificar se haveria diferença na viabilidade parasitária por interferência da técnica colorimétrica.

A isatina apresentou atividade tóxica contra *Leishmania* e o valor de IC50, calculado através da equação da reta de regressão linear, foi $63,23 \pm 3,39 \mu\text{g/mL}$. Na concentração de $62,5 \mu\text{g/mL}$, a viabilidade parasitária foi de $52,3 \pm 2,52\%$, não refletindo grande diferença quando comparada com a técnica colorimétrica. Não existem relatos na literatura sobre a avaliação da isatina quanto ao seu potencial anti-*Leishmania* por nenhum mecanismo de ação. A figura 27 demonstra a curva dose-resposta antiparasitária pela técnica de MTT.

Com a aplicação direta em cultura de formas promastigotas de *L. amazonensis*, o ácido gálico apresentou toxicidade somente nas concentrações mais elevadas (figura 28). O valor de IC50% foi $320,17 \pm 3,25 \mu\text{g/mL}$. Entre as concentrações de 250 e 500 $\mu\text{g/mL}$, a viabilidade parasitária variou entre $54,1 \pm 4,58$ e $38,7 \pm 3,06\%$, também não refletindo diferença significativa em comparação à técnica colorimétrica. A tabela X do anexo XI representa as absorbâncias e as porcentagens de crescimento parasitário em diferentes concentrações de ácido gálico.

Um artigo de revisão sobre o potencial antiparasitário de produtos naturais, elaborado por Kayser et al. (2002) evidencia que, em geral, o mecanismo de ação dos compostos fenólicos e flavonóides contra *Leishmania* está relacionado com a geração de radicais livres de oxigênio, modificação dos mecanismos de transporte, entre outros. Na literatura existem relatos sobre o potencial imunomodulador de flavonóides e taninos (inclusive o ácido gálico) sobre células (principalmente macrófagos) infectadas com *Leishmania*. Essas substâncias, em geral, estimulam a expressão de citocinas e óxido nítrico, fortalecendo a defesa contra o parasita na forma intracelular (KOLODZIEJ et al., 2001; RADTKE et al., 2004). O ácido gálico, como previamente mencionado, possui uma significativa atividade imunomoduladora em células infectadas com *Leishmania*, apresentando um efeito benéfico em condições infecciosas (RADTKE et al., 2004).

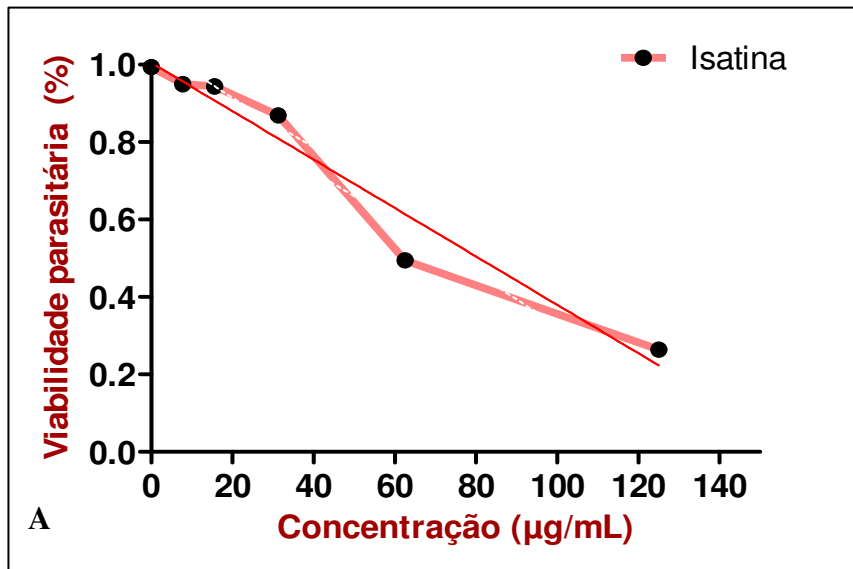
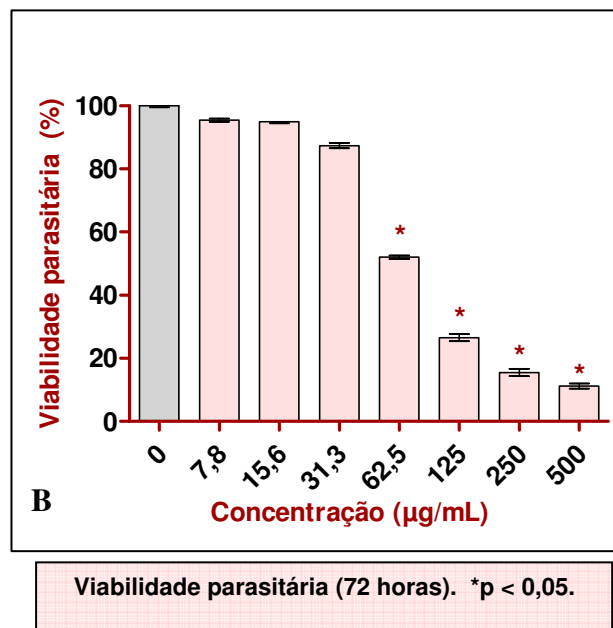


Figura 28 (A,B): Viabilidade de *L. amazonensis* na presença de isatina.

Foi utilizada uma suspensão de cultura de *L. amazonensis* (concentração de 5×10^8 parasitas/mL). Foi utilizada a técnica colorimétrica de MTT após a incubação por 72 horas na presença de diferentes concentrações de isatina. Somente parasitas em meio de cultura (LIT) foram utilizados como controle negativo, equivalendo a 100% de viabilidade parasitária. Cada ponto e barra representa a média \pm desvio padrão de 3 replicatas em 3 experimentos independentes.



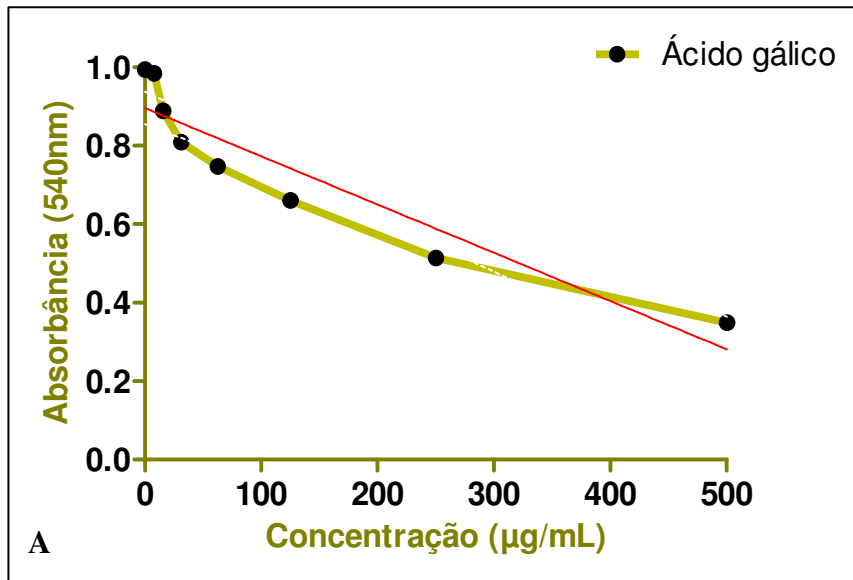


Figura 29: Viabilidade de *Leishmania amazonensis* na presença de ácido gálico.

Foi utilizada uma suspensão de cultura de *Leishmania amazonensis* (concentração de 5×10^8 parasitas/mL). Foi utilizada a técnica colorimétrica de MTT após a incubação por 72 horas na presença de diferentes concentrações de ácido gálico. Somente parasitas em meio de cultura (LIT) foram utilizados como controle negativo, equivalendo a 100% de viabilidade parasitária. Cada ponto e barra representa a média \pm desvio padrão de 3 replicatas em 3 experimentos independentes.

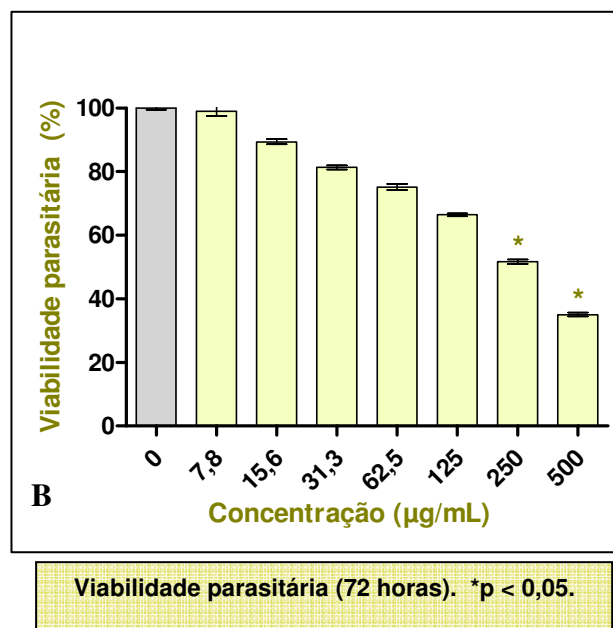


Tabela 28: Índices tóxicos (IC50) da isatina e do ácido gálico pela técnica de MTT.

SUBSTÂNCIAS	EXPERIMENTO 1	EXPERIMENTO 2	EXPERIMENTO 3	MÉDIA ± DESVIO
Isatina	67,2	60,2	62,3	63,6 ± 3,51
Ácido gálico	323,4	320,2	316,9	320,2 ± 3,25

Tabela 29: Análise estatística da contagem manual para avaliação da atividade anti-*Leishmania* da isatina e do ácido gálico.

SUBSTÂNCIAS (µg/mL)	EXPERIMENTO 1 (%)	EXPERIMENTO 2 (%)	EXPERIMENTO 3 (%)	MÉDIA ± DESVIO
Isatina				
0	100	98	100	99,3 ± 1,15
7,8	90	92	90	90,7 ± 1,15
15,6	90	95	92	92,3 ± 2,52
31,3	85	90	90	88,3 ± 2,89
62,5	55	52	50	52,3 ± 2,52
125,0	30	33	28	30,3 ± 2,52
250,0	18	25	15	19,3 ± 5,13
500,0	15	12	15	14,0 ± 1,73
Ácido gálico				
0	99	97	97	97,7 ± 1,15
7,8	98	97	99	98,0 ± 1,00
15,6	90	95	89	91,3 ± 3,21
31,3	80	85	82	82,3 ± 2,52
62,5	80	75	78	77,6 ± 2,52
125,0	70	65	68	67,7 ± 2,52
250,0	49	55	58	54,1 ± 4,58
500,0	42	36	38	38,7 ± 3,06
Pentamidina (5µg/mL)	48	55	52	51,7 ± 3,51

5.5. Avaliação da atividade anti-bacteriana

Os dados referentes às análises estatísticas das absorvâncias obtidas nos ensaios de microdiluição com todas as substâncias puras avaliadas estão no anexo VIII.

De todas as substâncias avaliadas pelo teste de difusão em agar, somente a isatina apresentou uma atividade significativa (CIM = 125 µg/mL para *E. coli* e 250 µg/mL para *S. aureus*) – (tabela 30). Pelo método de microdiluição, todas as substâncias apresentaram CIM e CBM com valores elevados, com exceção da isatina, com valores de CIM e CBM entre 62,5 e 250 µg/mL para as duas bactérias (tabela 31, figura 30).

Existem estudos sobre a estrutura x atividade anti-microbiana de derivados sintéticos da isatina (BACCHI et al., 2005; PERVEZ et al., 2008), nos quais algumas moléculas foram efetivas. Em relação ao antibiótico controle positivo (ciprofloxacina 35 µg/mL), destacamos a atividade anti-microbiana da isatina, principalmente contra *E. coli*. Não existem dados na literatura sobre estudos realizados com indirubina (tabelas 30 e 31, figura 31), assim como para o índigo, o qual não apresentou toxicidade nos experimentos de difusão em agar (tabela 30) e microdiluição para *S. aureus* (ATCC 25923) e *E. coli* (ATCC 25922) – (tabela 31, figura 32).

Tabela 30: Halos de inibição de crescimento obtidos nos ensaios de difusão em disco com as substâncias isoladas das espécies vegetais para *E. coli* e *S. aureus*.

TESTES	<i>Stafilococcus aureus</i> ATCC 25923		<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	
	Concentração %	mm (halo)	Concentração %	mm (halo)
DMSO (c. negativo)	5%	—	5%	—
	µg/mL (solução)	mm (halo)	µg/mL (solução)	mm (halo)
Ciprofloxacina (35µg/mL)		5,93 ± 0,21		4,84 ± 0,12
Substâncias isoladas				
Amentoflavona	> 1000	—	> 1000	—
Ácido Gálico	> 1000	—	> 1000	—
3,7-dirahmino-kaempferol	> 1000	—	> 1000	—
Rutina	> 1000	—	> 1000	—
Índigo	> 1000	—	> 1000	—
Indirubina	> 1000	—	> 1000	—
Isatina	250	2,81 ± 0,35	125	3,62 ± 0,35

Tabela 31: Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) das substâncias isoladas das espécies vegetais ($\mu\text{g/mL}$) para *S. aureus* e *E. coli* - método de microdiluição.

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA			
	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)		<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)
	CIM ($\mu\text{g/mL}$)	CBM ($\mu\text{g/mL}$)	CIM ($\mu\text{g/mL}$) CBM ($\mu\text{g/mL}$)
Isatina	62,5	250	62,5 125
Indigo	> 1000	> 1000	> 1000 > 1000
Amentoflavona	> 62,5	> 62,5	> 62,5 > 62,5
Kaempferol 3,7dira	> 1000	> 1000	> 1000 > 1000
Rutina	> 1000	> 1000	> 1000 > 1000
Ácido gálico	1000	> 10000	> 1000 > 1000
Acido quínico	> 1000	> 1000	> 1000 > 1000
Inderubina	> 62,5	> 62,5	> 62,5 > 62,5

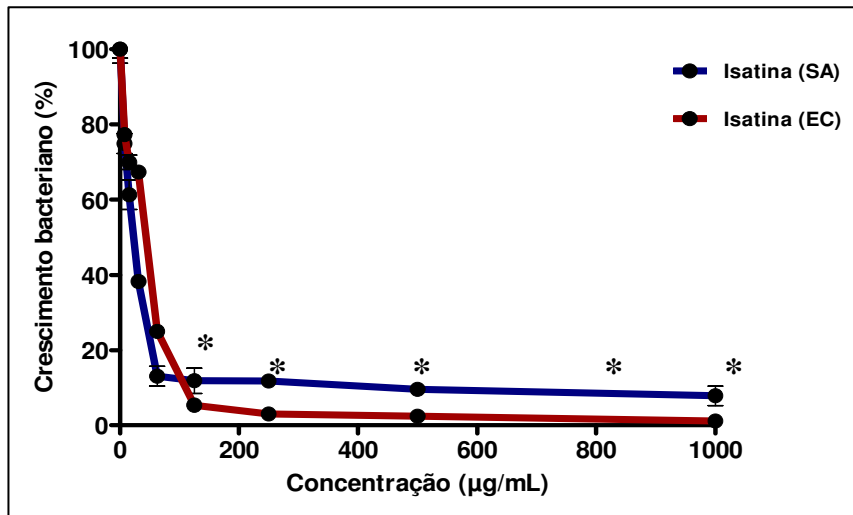


Figura 30: Crescimento de *E. coli* (EC) e *S. aureus* (SA) na presença de isatina.

As linhagens, na concentração de 10^6 bactérias/mL, foram incubadas por 24 horas na presença de diferentes concentrações de isatina. Após esse período, as microplacas foram submetidas às leituras visual, espectrofotométrica e com resazurina. As absorbâncias foram convertidas em valores de crescimento bacteriano (%). Os resultados estão expressos pela média \pm desvio padrão do crescimento bacteriano (%) para 3 replicatas e 3 experimentos independentes.

* $p < 0,05$.

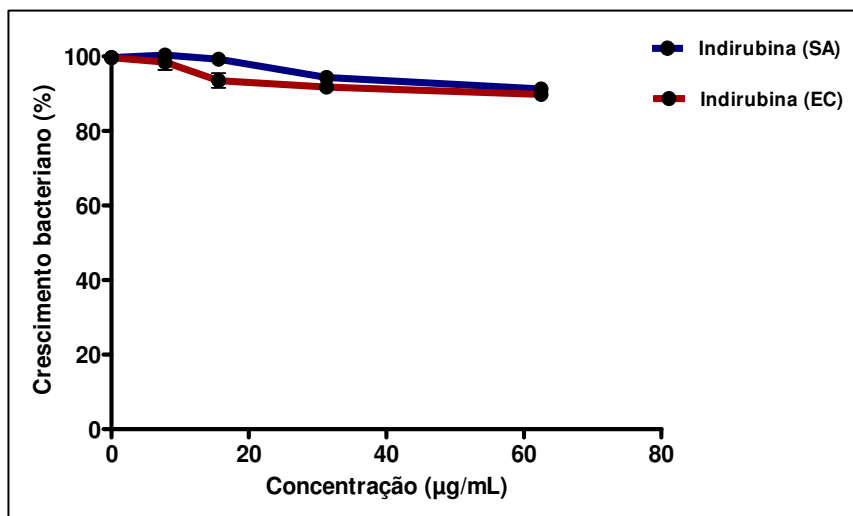


Figura 31: Crescimento de *E. coli* (EC) e *S. aureus* (SA) na presença de indirubina.

As linhagens, na concentração de 10^6 bactérias/mL, foram incubadas por 24 horas na presença de diferentes concentrações de indirubina. Após esse período, as microplacas foram submetidas às leituras visual, espectrofotométrica e com resazurina. As absorbâncias foram convertidas em valores de crescimento bacteriano (%). Os resultados estão expressos pela média \pm desvio padrão do crescimento bacteriano (%) para 3 replicatas e 3 experimentos independentes.

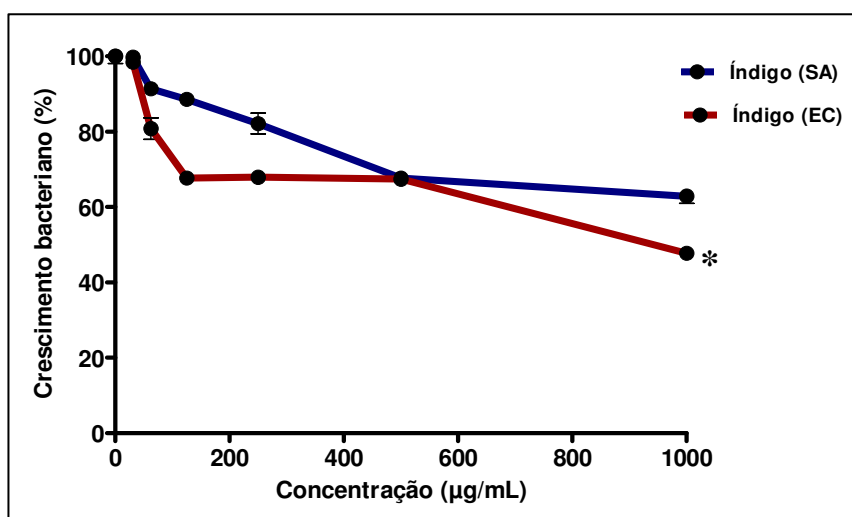


Figura 32: Crescimento de *E. coli* (EC) e *S. aureus* (SA) na presença índigo.

As linhagens, na concentração de 10^6 bactérias/mL, foram incubadas por 24 horas na presença de diferentes concentrações de índigo. Após esse período, as microplacas foram submetidas às leituras visual, espectrofotométrica e com resazurina. As absorbâncias foram convertidas em valores de crescimento bacteriano (%). Os resultados estão expressos pela média \pm desvio padrão do crescimento bacteriano (%) para 3 replicatas e 3 experimentos independentes.

* $p < 0,05$.

Os flavonóides avaliados também não apresentaram toxicidade detectável pelo ensaio disco-difusão com as linhagens utilizadas. De acordo com a literatura, a rutina possui moderada atividade tóxica (250 $\mu\text{g/mL}$) para *S. mutans*, presente na cavidade oral, detectável por difusão em agar (RIVERO-CRUZ et al., 2008), mas não foi possível detectar essa atividade em *Staphylococcus aureus* utilizando a mesma técnica (tabela 30) ou com microdiluição (tabela 31, figura 33).

Os estudos de Mbaveng et al. (2008), que avaliaram a atividade anti-microbiana de biflavonóides com várias linhagens bacterianas pelo método de disco difusão, também não detectaram essa atividade da amentoflavona contra *E. coli* e *S. aureus* (tabelas 30 e 31, figura 34).

Alguns estudos evidenciam o potencial antimicrobiano e antifúngico do ácido gálico (PENNA et al., 2001; PANIZZI et al., 2002). Através da metodologia de microdiluição, Kang et al. (2008) detectaram a atividade anti-microbiana do ácido gálico contra *S. mutans*,

inibindo a produção de biofilmes bacterianos na cavidade oral, porém a mesma atividade não foi observada para *E. coli* e *S. aureus* (SAXENA et al., 1994). Por disco-difusão, não foi possível detectar a atividade anti-microbiana do ácido gálico (tabela 30). Por microdiluição, foi possível detectar uma redução considerável do crescimento bacteriano nas duas linhagens (86,64% para *S. aureus* e 75,49% para *E. coli*), porém somente na maior concentração avaliada (1000µg/mL) – (tabela 31, figura 35). O ácido quínico não apresentou atividade anti-microbiana avaliada pelas duas metodologias (tabelas 30 e 31, figura 36).

Quanto ao kaempferol na forma aglicona, estudos evidenciam seu potencial antimicrobiano e sinérgico contra algumas bactérias, como *Propionibacterium acnes* (LIM et al., 2007), *Enterococcus faecalis* (Martini et al., 2004). Um estudo também relata ensaios de atividade anti-microbiana realizados com um derivado glicosilado do kaempferol, empregando a técnica de microdiluição (OZÇELIK et al., 2004) – (tabela 30), porém não pudemos evidenciar esse efeito com o derivado isolado de *I. truxillensis* sobre *S. aureus* (ATCC 25923) e *E. coli* (25922) com o método de disco-difusão (tabela 31, figura 37).

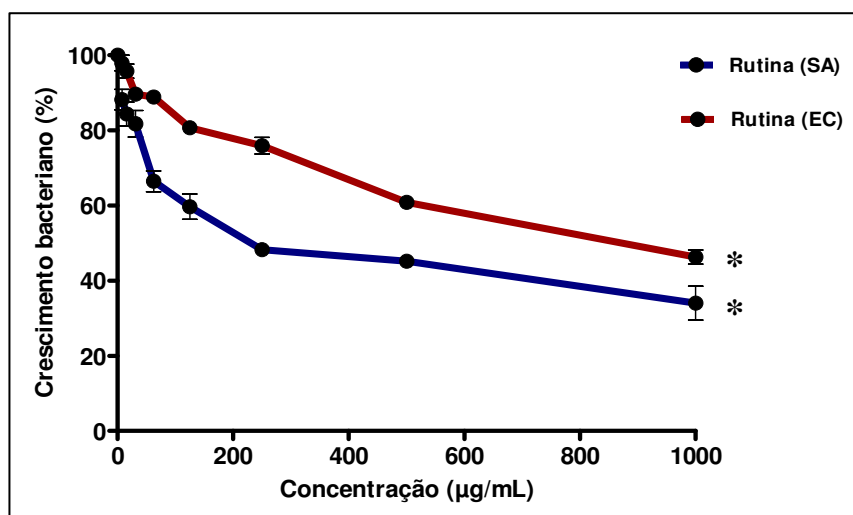


Figura 33: Crescimento de *E. coli* (EC) e *S. aureus* (SA) na presença rutina.

As linhagens, na concentração de 10^6 bactérias/mL, foram incubadas por 24 horas na presença de diferentes concentrações de rutina. Após esse período, as microplacas foram submetidas às leituras visual, espectrofotométrica e com resazurina. As absorbâncias foram convertidas em valores de crescimento bacteriano (%). Os resultados estão expressos pela média \pm desvio padrão do crescimento bacteriano (%) para 3 replicatas e 3 experimentos independentes.

* $p < 0,05$.

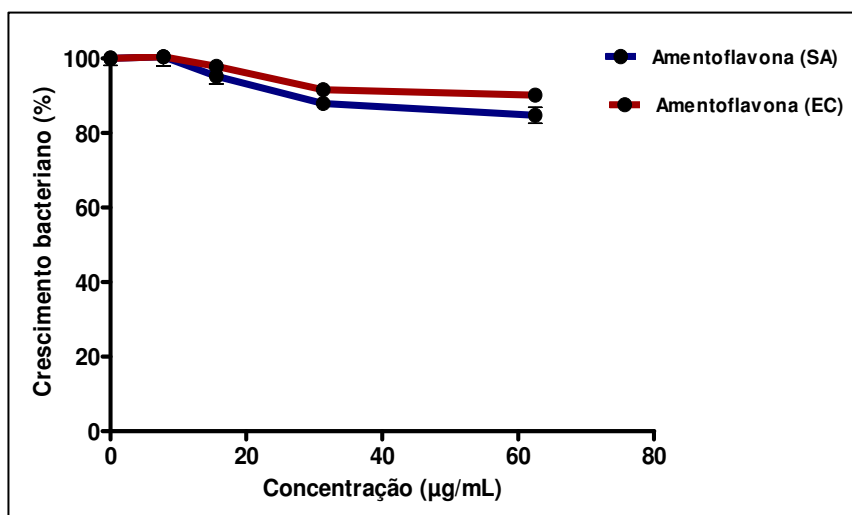


Figura 34: Crescimento de *E. coli* (EC) e *S. aureus* (SA) na presença de amentoflavona.

As linhagens, na concentração de 10^6 bactérias/mL, foram incubadas por 24 horas na presença de diferentes concentrações de amentoflavona. Após esse período, as microplacas foram submetidas às leituras visual, espectrofotométrica e com resazurina. As absorbâncias foram convertidas em valores de crescimento bacteriano (%). Os resultados estão expressos pela média \pm desvio padrão do crescimento bacteriano (%) para 3 replicatas e 3 experimentos independentes.

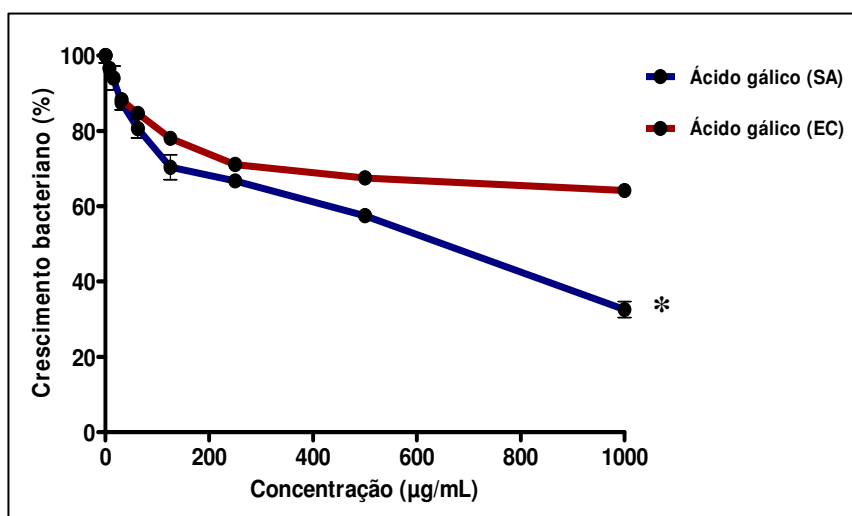


Figura 35: Crescimento de *E. coli* (EC) e *S. aureus* (SA) na presença de ácido gálico.

As linhagens, na concentração de 10^6 bactérias/mL, foram incubadas por 24 horas na presença de diferentes concentrações de ácido gálico. Após esse período, as microplacas foram submetidas às leituras visual, espectrofotométrica e com resazurina. As absorbâncias foram convertidas em valores de crescimento bacteriano (%). Os resultados estão expressos pela média \pm desvio padrão do crescimento bacteriano (%) para 3 replicatas e 3 experimentos independentes.

* $p < 0,05$.

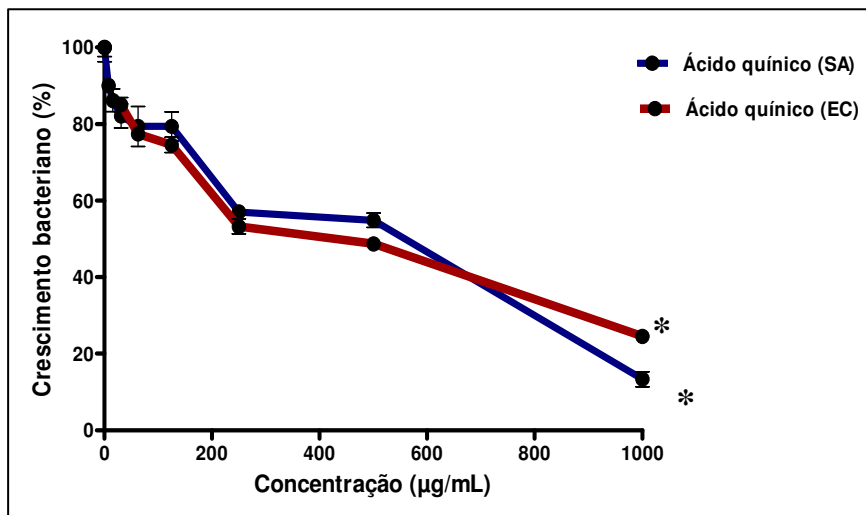


Figura 36: Crescimento de *E. coli* (EC) e *S. aureus* (SA) na presença de ácido quínico.

As linhagens, na concentração de 10^6 bactérias/mL, foram incubadas por 24 horas na presença de diferentes concentrações de ácido quínico. Após esse período, as microplacas foram submetidas às leituras visual, espectrofométrica e com resazurina. As absorbâncias foram convertidas em valores de crescimento bacteriano (%). Os resultados estão expressos pela média \pm desvio padrão do crescimento bacteriano (%) para 3 replicatas e 3 experimentos independentes.

* $p < 0,05$.

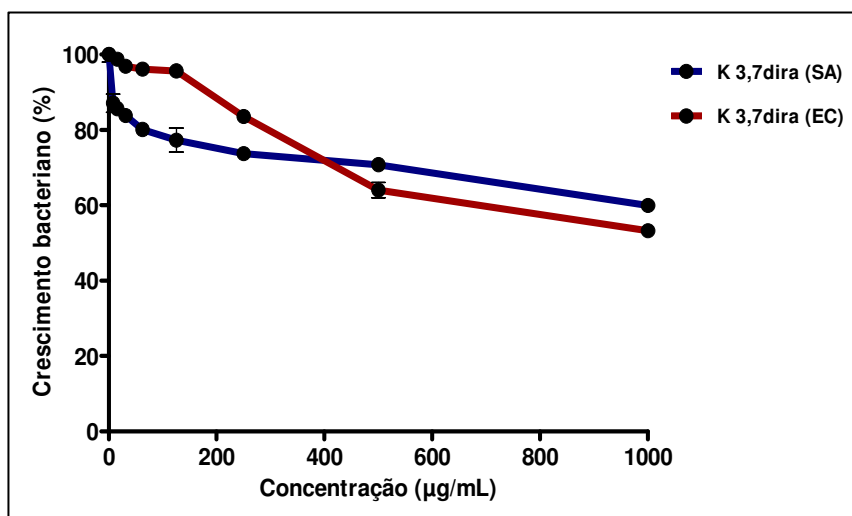


Figura 37: Crescimento de *E. coli* (EC) e *S. aureus* (SA) na presença de kaempferol-3,7-dira.

As linhagens, na concentração de 10^6 bactérias/mL, foram incubadas por 24 horas na presença de diferentes concentrações de k-3,7-dira. Após esse período, as microplacas foram submetidas às leituras visual, espectrofométrica e com resazurina. As absorbâncias foram convertidas em valores de crescimento bacteriano (%). Os resultados estão expressos pela média \pm desvio padrão do crescimento bacteriano (%) para 3 replicatas e 3 experimentos independentes.

Embora tenhamos obtido resultados negativos para os flavonóides isolados dessas espécies, é importante ressaltar a necessidade de estudos futuros realizados com a combinação dos mesmos entre si e com antibióticos conhecidos, já que existem muitas evidências na literatura que podem refletir no potencial sinérgico de moléculas naturais.

6. CONCLUSÕES

“A recompensa de uma coisa bem feita é simplesmente a de tê-la feito”.

(Ralph Waldo Emerson)

De acordo com os resultados obtidos podemos concluir que:

a) **Nos ensaios de mutagenicidade**, os extratos (metanólico e clorofórmico) de *B. fagifolia*, assim como as frações do extrato metanólico, não apresentaram efeito mutagênico. As substâncias isoladas do extrato metanólico apresentaram apenas indícios de mutagenicidade sem ativação (ácido gálico, galato de metila e ácido quínico) e com ativação metabólica (derivado galoilquínico). O extrato metanólico de *I. truxillensis* apresentou efeito mutagênico, embora as frações de flavonóides e alcalóides desse extrato tenham apresentado apenas indícios de mutagenicidade. Quanto a *I. suffruticosa*, o extrato metanólico apresentou apenas indícios de mutagenicidade, assim como as frações de alcalóides e flavonóides. O derivado glicosilado do kaempferol apresentou indício de mutagenicidade nas concentrações testadas (-S9, +S9). Quanto às substâncias comuns ao gênero avaliadas pelo teste de Ames, destacamos o índigo, que se apresentou altamente mutagênico após a metabolização. A isatina (precursor biossintético) e a indirubina (isômero) foram mutagênicas sem metabolização.

b) **Quanto aos ensaios de atividade fitoestrogênica**, a rutina e o kaempferol-3,7-diraminosídeo apresentaram efeito estrogênico de $3,03 \pm 0,64$ e $1,52 \pm 0,15$, detectados por e-screen com células MCF7 BUS e foi comprovado, através do ensaio na presença de ICI, que o mecanismo envolvido nessa atividade foi via receptor. A avaliação da atividade anti-

estrogênica, tanto via receptor (na presença de estradiol) como por inibição da enzima aromatase (na presença de testosterona) foram negativos para as moléculas avaliadas (ácido gálico, amentoflavona, rutina e kaempferol-3,7-diraminosídeo);

c) **Nos ensaios de atividade citotóxica**, os valores de IC50 da isatina com 24, 48 e 72 horas de incubação foram 52,32; 49,02; 41,44 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. O ácido gálico também foi citotóxico nessa linhagem com 24, 48 e 72 horas de incubação (IC50 = 60,25; 62,61; 60,25 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente). As demais moléculas avaliadas (amentoflavona, rutina, ácido quínico, índigo, indirubina e kaempferol-3,7-diraminosídeo) apresentaram altos valores de IC50, sendo consideradas atóxicas para essa linhagem tumoral.

d) **Nos ensaios de atividade antimicrobiana**, realizados através dos métodos de disco-difusão e microdiluição, a isatina também se mostrou efetiva contra *E. coli* (ATCC 25922) e *S. aureus* (ATCC 25923) e, dependendo da concentração, apresentou efeito bactericida (250 $\mu\text{g/mL}$ para *S. aureus* e 125 $\mu\text{g/mL}$ para *E. coli*). Algumas substâncias, como o índigo, a rutina, o ácido gálico, o ácido quínico e o kaempferol-3,7-diraminosídeo, reduziram entre 30 e 80% o crescimento bacteriano, porém esse efeito foi observado apenas na maior concentração avaliada por microdiluição (1000 $\mu\text{g/mL}$);

e) **Nos ensaios anti-*Leishmania***, realizados por MTT e contagem manual, a isatina apresentou IC50 = 63,23 $\mu\text{g/mL}$, com redução de 52,3% da viabilidade celular na concentração de 62,5 $\mu\text{g/mL}$. O ácido gálico não apresentou toxicidade significativa sobre *L. amazonensis*, com IC50 = 320,17 $\mu\text{g/mL}$. Entre as concentrações de 250 e 500 $\mu\text{g/mL}$, a viabilidade parasitária variou entre 54,1 e 38,7%, quando avaliada por contagem manual.

Das substâncias isoladas avaliadas, **a isatina** apresentou atividade em todos os testes, merecendo destaque em futuros estudos estrutura x atividade, além da relação entre a biossíntese vegetal envolvendo a isatina e seus derivados com as atividades biológicas associadas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, R.M.; DAVID, J.P.; DAVID, J.M. Unusual naphthoquinones, catechin and triterpene from *Byrsonima microphylla*. **Phytochem.**, v. 66, p. 2388 -2392, 2005.

AGRAWAL, P. K. Carbon-13 NMR of Flavonoids. Amsterdam. **Elsevier**, 564 p., 1989.

ALBERTAZZI, P.; PURDIC, D. The nature and utility of the phytoestrogens: a review of the evidence. **Maturit.**, v. 42, p. 173 -185, 2002.

ALVES, L. V.; CAVALHEIRO, M. M. C.; CYSNE-FINKELSTEIN, L.; LEON, L. *In vitro* antiproliferative effects of several diaryl derivatives on *Leishmania* spp. **Biol. Pharma. Bull.**, v. 26 (4), p. 453 - 456, 2003.

ALBUQUERQUE, U.P. Uso das plantas e a concepção de doença e cura nos cultos afro-brasileiros. **Rev. Ciên. & Tópico**, v. 22, nº 2, p. 197 - 210, 2006.

ALLEMANN, C. HERREN, D. BADERTSCHER, K.M. Requirements for quality of approved plant medicines. **Ther. Umsch.**, v. 59, nº 6, p. 267-273, 2002.

AL MESHAL, I.A.; MOSSA, J.S.; AL YAYA, M.A.; KHATIB, A.; HAMMOUDA, Y. **Fitoterapia**, v. 53, p. 79, 1982.

ALVES, D.L.; SILVA, C.R. Fitohormônios: Abordagem Natural da Terapia Hormonal. São Paulo, SP, Atheneu, 2002.

ALVES, C.Q.; BRANDÃO, H.N.; DAVID, J.N.; DAVID, J.P.; LIMA, L.S. Avaliação da atividade antioxidante de flavonóides. **Diálogos & Ciência**, ano 5, nº 12, p. 1 - 8, 2007

ALVES, R.B.; PEREIRA, M.M.; JÁCOME, L.R.L.P.; ALCÂNTARA, A.F.C.; RASLAN, D.S. Alcalóides indólicos isolados de espécies do gênero *Aspidosperma* (Apocynaceae). **Quím. Nova**, v. 30, nº 4, 2007.

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

AMOS, S.; KOLAWOLE, E.; AKAH, P.; WAMBEBE, C.; GAMANIEL, K. Behavioral effects of the aqueous extract of *Guiera senegalensis* in mice and rats. **Phytomed.**, v. 8, nº 5, p. 356 - 361, 2001.

ANDRADE, S.M.S.; PEREIRA, F.L. Câncer Colorretal Sincrônico – relato de caso e revisão de literatura. **Ver. Bras. Coloproct.**, v. 27, nº1, p. 69 - 79, 2007.

ANDROUTSOPOULOS, V.; WILSHER, N.; ARROO, R.J.; POTTER, G.A. Bioactivation of the phytoestrogen diosmetin by CYP1 cytochromes P450. **C. Let.**, v. 274, p. 54 - 60, 2009.

APOLINARIO, R.M.; VAN DER VALK, P.; JONG, J.S.; DEVILLE, W.; VAN ARKE-OTTE, J.; DINGEMANS, A.M.; Prognostic value of the expression p53, bcl2, and bx oncoproteins and neovascularization in patients with radically resected non-small-cell lung cancer. **J. Clin. Oncol.**, v. 15, p. 2456 - 2466, 1997.

ARIÊ, W.M.Y.; FONSECA, A.M.; ARIÊ, M.H.A.; BAGNOLI, V.R.; JUNQUEIRA, P.A.A.; PINOTTI, J.A. Fitoestrogênios. **Rev. de Ginecol. & Obstetr.**, v. 12, nº 1, p. 27 - 36, 2001.

- ARÁMBULA, S.L. A primera vista. **Rev. Énfasis Alimentación**, v. 2, p. 6 - 18, 2003.
- ARAÚJO, C.A.C.; ALEGRIO, L.V†; LEON, L.L. Antileishmanial activity of compounds extracted and characterized from *Centrolobium sclerophyllum*. **Phytochem.**, v. 49, nº 3, p. 751 - 754, 1998.
- ARAÚJO, A.R. Ameaçado de Extinção. **Boletim Informativo da UFMG**, nº 1567, ano 33, Imprensa Universitária, Belo Horizonte, MG, 2007.
- ARAÚJO, R.V.S.; JÚNIOR, M.R.M.; MOTA, C.R.F.C.; MELO, J.H.L.; FLORÊNCIO, A.P.S. Study of the antitumoral activity of a polysaccharide from *Anacardium occidentale* (PJU) using the sarcoma 180 experimental model. **Rev. Eletron. Farm.**, v. IV, nº 1, p. 61 - 65, 2007.
- ASLANI, A.; et al. The predictive value of body protein for chemotherapy-induced toxicity. **Cancer**, v. 88, p. 796 - 803, 2000.
- ASOCIACIÓN ARGENTINA DE FITOTERAPIA.
Disponível em <http://www.plantasmedicinales.org/historia.htm>
data de acesso 04/09/2007.
- ASOLINI, F.C.; TEDESCO, A.M.; CARPES, S.T. Atividade antioxidante e antibacteriana dos compostos fenólicos dos extratos de plantas usadas como chás. **Braz. J. of Food Technol.**, v. 9, nº 3, p. 209 - 215, 2006.
- AWAD, A. B.; FINK, C. S. Phytosterols as anticancer dietary components: Evidence and mechanism of action. **J. of Nutrit.**, v. 130, p. 2127 - 2130, 2000.
- AZEVEDO, R.F.; SANTOS, S.R.; MARTINS, L.A.; Bacteria cause of gastrointestinal disorders related to hygienic habits in students of the surveillance and epidemiology in health UNIPAR. **Hig. Aliment.**, v. 21, nº 153, p. 106 -110, 2007.
- BACCHI, A.; CARCELLI, M.; PELAGATTI, P.; PELIZZI, G.; R-ARGUELLES, M.C.; ROGOLINO, D.; SOLINAS, C.; ZANI, F. Antimicrobial and mutagenic properties of organotin(IV) complexes with isatin and N-alkylisatin bithiocarbonohydrazones. **J. Inorg. Biochem.**, v. 99, p. 397 - 408, 2005.
- BAKER, V.L.; JAFFER, R.B. Clinical uses of antiestrogens. **Obstet. Gynecol. Surv.**, v. 51, p. 45 - 59, 1995.
- BAL, T.R.; ANAND, B.; YOGESHWARI, P.; SRIRAM, D. Synthesis and evaluation of anti-HIV activity of isatin *b*-thiosemicarbazone derivatives. **Bioorg. Med. Chem. Let.**, v. 15, p. 4451 - 4455, 2005.
- BALFOUR, J.P. Indigo. British Mus. Press, London, (264 pp.), 1998.
- BANERJEE, T.; VAN DER VLIET, A.; ZIBOH, V.A. Downregulation of COX-2 and iNOS by amentoflavone and quercetin in A549 human lung adenocarcinoma cell line. **Prost. Leuc. Ess. Ac. Fact.**, v. 66, nº 5 - 6, p. 485 - 492, 2002.

- BARBASTEFANO, V.; FARIAS SILVA, E.; COLA MIRANDA, M.; CALVO, T.; LUIZ FERREIRA, A.; PIMENTEL, F. O.; MICHELATTO, D. D.; HIRUMA LIMA, C. A.; VILEGAS, W.; SOUZA BRITO, A. R. M. Antioxidant activity of an aqueous fraction obtained from *Indigofera truxillensis* against ischemia-reperfusion-induced gastric lesions. **Plant. Med.**, v. 72, nº 11, p. 1038 - 1038, 2006.
- BAUER, A. W.; KIRBY, W. M. N.; SHERRIS, J. C.; TURCKY, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **Am. J. Clin. Phatol.**, v. 45, p. 493 - 496, 1966.
- BHARATE, S. B.; BHUTANI, K. K.; KHAN, S. I.; TEKWANI, B. L.; JACOB, M. R.; IKHLAS, A.; KHAN, I. A.; SINGH, I. P. Biomimetic synthesis, antimicrobial, antileishmanial and antimalarial activities of euglobals and their analogues. **Bioorg. & Med. Chem.**, v. 14, p. 1750 - 1760, 2005.
- BECHTOLD, T.; TURCANU, A.; GEISLER, S.; GANGLBERGER, E. Process balance and product quality in the production of natural índigo from *Polygonum tinctorium* Ait. applying low-technology methods. **Bioresour. Technol.**, v. 81, p. 171 - 177, 2002.
- BENSKY, D.; CLAVEY, S.; STOGER, E.; GAMBLE, A. Chinese Herbal Medicine. **Materia Medica** (3rd edn), Eastland Press, Seattle, 1986.
- BOLZANI, V.S.; SILVA, D.H.S.; PINTO, A.C.; LOPES, N.P; EPIFANIO, R.A. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Quím. Nova**, v. 25, nº 1, 2002.
- BORA, K.; MIGUEL, O.G.; ANDRADE, C.A.; OLIVEIRA, A.O.T. Determinação da concentração de polifenóis e do potencial antioxidante das diferentes frações do extrato de folhas de *Dicksonia sellowiana*, (Presl.) Hook, DICKSON IACEAE. **Visão Academ.**, v. 6, nº 2, p. 6 -15, 2005.
- BORRIS, R. Chemistry, biological and pharmacological properties of medicinal plants from the Americas. **Proceedings of the IOCD/CYTED Symposium**, Panama, p. 43, 1997.
- BOTSARIS, A.S. Medicina complementar: vantagens e questionamentos sobre as terapias não-convencionais. **Med. Ayurvédica**. Rio de Janeiro, RJ, Nova Era, 2004.
- BRAGA, F.G.; BOUZADA, M.L.M.; FABRI, R.L.; MATOS, M.L.; MOREIRA, F.O.; SCIO, E.; COIMBRA, E.S. Antileishmanial and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil. **J. Ethnopharmacol.**, v. 111, p. 396 - 402, 2007.
- BRAGANÇA, F.C.R. Considerações sobre o histórico dos medicamentos e plantas medicinais. **Plantas medicinais antidiabéticas: uma abordagem multidisciplinar**. Niterói, RJ, Editora da UFF, 1996.
- BRANDÃO, D.C.; História da Fitoterapia no Brasil. **Arquivos da PHC Pharma Consulting**, São Paulo, SP, 2005.
- BREINHOLT, V.; LARSEN, J.C. Detection of Weak Estrogenic Flavonoids Using a Recombinant Yest Strain and a Modified MCF7 Cell Proliferation Assay. **Chem. Res. Toxicol.**, v. 11, p. 622 - 629, 1998.

BREINHOLT, V. Desirable versus harmful levels of intake of flavonoids and phenolic Acids: In Natural Antioxidants and Anticarcinogens in Nutrition, Health and Disease.(Kumpulainen J., Salonen J.);**The Royal Soc. Chem.**: Cambridge, UK., 1999.

BUOLAMWINI, J.K. Cell cycle molecular targets in novel anticancer drug discovery. **Curr. Pharm. Des.**, v. 6, p. 379 - 392, 2000.

CACERES, A.; CANO, O.; SAMAYOA, B.; AGUILAR, L. Plants used in Guatemala for the treatment of gastrointestinal disorders. 1. screening of 84 plants against enterobacteria. **J. Ethnopharmacol.**, v. 30, p. 55 - 73, 1990.

CALVO, T.R. Uso sustentável da biodiversidade brasileira – prospecção químico-farmacológica em plantas superiores: *Alchornea glandulosa*, *Alchornea triplinervia* (Euphorbiaceae), *Indigofera truxillensis* e *Indigofera suffruticosa* (Fabaceae). **Tese de doutorado**, IQ – UNESP, Araraquara, SP – Brasil, 2007.

CANNELL, R.J.P.; Natural products isolation: methods in biotechnology. **Human. Press.**, v. 4, p. 473, 1998.

CAO, S.; RANARIVELO, L.; RATSIMBASON, M.; RANDRIANASOLO, S.; RATOVOSON, F.; ANDRIANJAFY, M.; KINGSTON, D.G.I. Antiplasmodial activity of Compounds from *Sloanea rhodantha* (Baker) Capuron var. *rhodantha* from the Madagascar Rain Forest. **Plant. Med.**, v. 72, p. 1438 - 1440, 2006.

CARDEÑO, A.V.; MOLINA, C.M.; MIRANDA, I.; GARCÍA, G.T.; MORALES, J.M.; STASHENKO, E.E. Actividad antioxidante y contenido total de fenoles de los extractos etanólicos de *Salvia aratocensis*, *Salvia sochensis*, *Bidens reptans* y *Montanoa ovatifolia*. **Scient. et Techn.**, año XIII, nº 33, p. 205 - 207, 2007.

CARDOSO, C.R.P. Atividade mutagênica e ativadora da resposta imune celular induzidas por *Byrsonima crassa* Niedenzu e *Byrsonima intermédia* A. Juss (Malpighiaceae). **Dissertação de Mestrado**, FCFAr – UNESP, Araraquara, SP – Brasil, 2006.

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. **Toxicol.**, v. 255, p. 55 - 63, 2006.

CARLINI, E. O primeiro remédio brasileiro.
Disponível em <http://www.unifesp.br>
data de acesso 07/01/2008.

CARRARA JR., E.; MEIRELLES, H. A Indústria Química e o Desenvolvimento do Brasil. São Paulo, SP, Metalivros, 1996.

CARVALHO, P.B.; FERREIRA, E.I. Leishmaniasis phytotherapy. Nature's leadership against an ancient disease-review. **Fitoterapia**, v. 72, p. 599 - 718, 2001.

CARVALHO, M.G.; DANIEL, J.F.S.; SUZART, L.R. Diversidade flavonoídica e aspectos farmacológicos em espécies dos gêneros *Ouratea* e *Luxemburgia* (OCHNACEAE). **Quim. Nova**, v. 30, nº 4, p. 984 - 987, 2007.

- CASTANHO, F.L.; FUNKE, M.G.; FRANÇA, L.P. *Ginkgo biloba* e câncer. **ConScientiae e Saúde**, v. 6, nº1, p. 63 - 69, 2007.
- CERCHIARO, G.; AQUILANO, K.; FILOMENI, G.; ROTILIO, G.; CIRIOLO, M.R.; FERREIRA, A.M.C. Isatin-Schiff base copper(II) complexes and their influence on cellular viability. **J. Inorg. Biochem.**, v. 99, p. 1433 -1440, 2005.
- CHAN-BACAB, M.J.; PEÑA-RODRÍGUEZ, L.M. Plant natural products with leishmanicidal activity. **Nat. Prod. Rep.**, v. 18, p. 674 - 688, 2001.
- CHANG, C-W.; LIN, M-T.; LEE, S-S.; CHEN-LIU, K.C.S.; HSU, F-L.; LIN, J-Y. Differential inhibition of reverse transcriptase and cellular DNA polymerase- α activities by lignans isolated from Chinese herbs, *Phyllanthus myrtifolius* Moon, and tannins from *Lonicera japonica* Thunb and *Castanopsis hystrix*. **Antiviral Resers.**, v. 27, p. 367 - 374, 1995.
- CHEN, D.H.; XIE, J.X. Chemical constituents of tradicional Chinese medicine Qing Dai. **Chin. Trad. Herb Drugs**, v. 15, p. 6 - 8, 1984.
- CHEN, J.; CHANG, H.W.; KIM, H.P.; PARK, H. Synthesis of phospholipase A2 inhibitory biflavonoids. **Bioorg. Med. Chem. Let.**, v. 16, p. 2373 - 2375, 2006.
- CHIECHI, K.M. Dietary phytoestrogens in the prevention of long-term postmenopausal diseases. **Int. J. Gynecol. Obstet.**, v. 67, p. 39 - 40, 1999.
- CHEN, S. C.; CHUNG, K. T. Mutagenicity and antimutagenicity studies of tannic acid and its related compounds. **Food and Chem. Toxicol.**, v. 38, p. 1 - 5, 2000.
- CHEN, L-R; WANG, Y-C.; LIN, Y.W.; CHOU, S.Y.; CHEN, S.F.; LUI, L.T.; WU, Y-T; KUO, C-J.; CHEN, T.S-S.; JUANG, S-H. Synthesis and evaluation of isatin derivatives as effective SARS coronavirus 3CL protease inhibitors. **Bioorg. Med. Chem. Let.**, v. 15, p. 3058 - 3062, 2005.
- CHRISTINA, A.J.M.; M. JOSEA, M.A.; ROBERTA, S.J.H.; KOTHAIA, R.; CHIDAMBARANATHANA, N.; MUTHUMANIB, P. Effect of *Indigofera aspalathoides* against Dalton's ascitic lymphoma. **Fitoterapia**, v. 74, p. 280 - 283, 2003.
- CHUNG, Y.C.; CHIEN, C.T.; TENG, K.Y.; CHOU, S.T.; Antioxidative and mutagenic properties of *Zanthoxylum ailanthoides* Sieb & zucc. **Food and Chem. Toxicol.**, v. 43, p. 247 - 252, 2005.
- COGHI, P.; VAIANA, N.; PEZZANO, M.G.; RIZZI, L.; KAISER, M.; BRUN, R.; ROMEO, S. Parallel synthesis and antileishmanial activity of ether-linked phospholipids. **Bio. Med. Chem. Lett.**, v. 18, p. 4658 - 4660, 2008.
- COLA-MIRANDA, M. BARBASTEFANO, V.; HIRUMA-LIMA, C.A.; CALVO, T.A.; VILEGAS, W.; BRITO, A.R.M.S.; Antiulcerogenic activity of *Indigofera truxillensis* Kunth. **Biota Neotropica**, v. 6, nº 3, 2006.
- CONSTANTINOU, A.; HUBERMAN, E. Genistein as an inducer of tumor cell differentiation: possible mechanism of action. **Proc. Nat. Academ.Sci. USA**, v. 208, p. 109 -115, 1995.

- CORNWELL, T.; COHICK, W.; RASKIN, I. Dietary phytoestrogens and health. **Phytochem.**, v. 65, p. 995 -1016, 2004.
- COSTA, S.L.; EL-BACHÁ, R.S.; COSTA, M.F.D.; BATATINHA, M.J.M.; VELOZO, E.S.; SILVA, A.R.; SILVA, V.D.A.; SOUZA, C.S.; HUGHES, J.B.; BARRETO, R.A. O alcalóide monocrotalina, extraído de *Crotalaria retusa*, altera a expressão de GFAP, a morfologia e o crescimento de culturas primárias de astrócitos. **Rev. Bras. Saúde Prod. An.**, v. 7, nº 2, p. 112 - 117, 2006.
- COSTA, C.F.; COIMBRA, E.S.; BRAGA, F.G.; REIS, R.C.N.; SILVA, A.D.; ALMEIDA, M.V. Preparation and antileishmanial activity of lipophilic N-alkyl diamines. **Biom. Pharmacoth.**, v. 63, p. 40 - 42, 2009.
- COUTINHO, L.M. O bioma do cerrado. In: Eugen Warming e o cerrado brasileiro – um século depois. São Paulo, SP, Editora UNESP, 2002.
- CROCE, C.; SOZZI, G.; HUEBNERK. Role of FHIT in human cancer. **J. Clin. Oncol.**, v. 17, p. 1618 -1624, 1999.
- DE FLORA, S. Mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. **Mutation Res.**, v. 402, p. 151 - 158, 1998.
- DEWELL, A.; HOLLENBECK, C.B.; BRUCE, B. The effects of soy-derived phytoestrogens on serum lipids and lipoproteins in moderately hypercholesterolemic postmenopausal women. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 87, p. 118 -121, 2002.
- DI STASI, L.C.; HIRUMA-LIMA, C.A. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. Editora UNESP, 2ª edição, São Paulo, SP, 2002.
- DOLL, R. An overview of the epidemiological evidence linking diet and cancer. **Proc. Nutr. Soc.**, v. 49, p. 119 -131, 1990.
- DU PENHOAT, C.H.; SCALBERT, A.; LAPREVOTE, O.; FAUCHEUR, N.; MICHON, V.; RAMINOSOA, M.; MILA, I.; LAMPIRE, O. Polyphenols isolated from the bark of *Catanea sativa* Mill. chemical structures and auto-association in honour of professor G.H.Neil Towers 75th birthday. **Phytochem.**, v. 49, p. 623 - 631, 1998.
- EBLING, L.; WEISS, R.M.; TEUFELHOFER, O.; UHI, M.; KNASMUELLER, S.; SCHULTE-HERMANN, R.; BERGER, W.; MICKSHE, M.; Green tea extract and (-) epigallocatechin-3-gallate, the major tea catechin exert oxidant but lack antioxidant activities. **FASEB J.**, v. 19, p. 248 - 437, 2005.
- ELDIN SUE et al. Herbal Medicine in Primary Care. **A Fitoterapia ontem e hoje**. São Paulo, SP, Manole, edição brasileira, 2001.
- ELLOF, J.N.A. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. **Planta Med.**, v. 64, p. 711 - 713, 1998.
- ELVIN-LEWIS, M. Should we be concerned about herbal remedies. **J. Ethnopharm.**, v. 75, p. 141 -161, 2001.
- FABER, K.A.; HUGHES, C.L.; Dose-response characteristics of neonatal exposure to genistein on pituitary responsiveness to gonadotropin releasing hormone and volume of the

- sexually dimorphic nucleus of the preoptic area (SDN – POA) in postpubertal castrated female rats. **Reprod. Toxicol.**, v. 7, p. 35 - 39, 1993.
- FARIED, A.; KURNIA, D.; FARIED, L.S.; USMAN, N.; MUJAZAKI, T.; KATO, H.; KUWANO, H. Anticancer effects of acid gallic isolated from Indonesian herbal medicine, *Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl, n human cancer cell lines. **Int. J. Oncol.**, v. 30, p. 605 - 613, 2007.
- FERREIRA, I.C.D.F.; VARGAS, V.M.F.; Mutagenicity of medicinal plant extracts in *Salmonella*/microsome assay. **Phytot. Res.**, v.13, nº 5, p. 397 - 400, 1999.
- FERRO, D. **Fitoterapia: conceitos clínicos**. Atheneu, Ribeirão Preto, SP, 2006.
- FETROW, C.W. et al. Manual de Medicina Alternativa para o Profissional. **História da Fitoterapia**. Rio de Janeiro, RJ, Guanabara Koogan, 1999.
- FEUER, E.J.; WUN, L.; BORING, C.C. The life time risk of developing breast cancer. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 85, p. 892 - 897, 1993.
- FIGUEREDO, C.M.S.; CRISPINO, A.S.; TINOCO, E.M.B. Níveis elevados de metaloproteinase da matriz 9 em sítios com destruição tecidual de pacientes com periodontite crônica generalizada. **Ver. Ciênc. Méd. Biol.**, v. 2, nº 1, p. 40 - 47, 2003.
- FLORÊNCIO, A.P.S.; MELO, J.H.L.; MOTA, C.R.F.C.; MELO JÚNIOR, M.R.; ARAÚJO, R.V.S. Estudo da atividade antitumoral do polissacarídeo (PJU) extraído de *Anacardium occidentale* frente a um modelo experimental do sarcoma 180. **Rev. Eletron. de Farmácia**, v. 4, nº 1, p. 61 - 65, 2007.
- FONG, K.M.; SEKIDO, Y.; MINNA, J.D. Molecular pathogenesis of lung cancer. **J.Thor. Cardiovasc. Surg.**, v. 118, p. 1136 - 1152, 1999.
- FONSECA, A.M.; AGUIAR, L.M.; BAGNOLI, V.R.; MINAMI, C.R.S.; in: FONSECA et al., (Eds); **Climatério: Terapêutica Não Hormonal**. São Paulo, SP, Roca, p. 371 - 388, 2005.
- FORÈS, R. Atlas das plantas medicinais e curativas: a saúde através das plantas. **A fitoterapia ao longo da história**. Cotia, SP, Vergara Brasil, 2004.
- FOTSIS, T.; PEPPER, M.; ADLERCREUTZ, H. Genistein, a dietary derived inhibitor of *in vitro* angiogenesis. **Proc. Nat. Academ. Sci. USA**, v. 90, p. 2690 - 2694, 1993.
- FOTSIS, T.; PEPPER, M.; ADLERCREUTZ, H. Genistein, a dietary ingested isoflavonoid, inhibits cellproliferation and in vivo angiogenesis. **J. Nutr.**, v. 125, p. 790 - 797, 1995.
- FREEDBERG, D. Ciência, **Comércio e Arte em o Brasil dos Holandeses**. Rio de Janeiro, RJ, GMT Editores Ltda, 1999.
- 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.
- GODOY, H.T.; PRADO, M.A. Determinação de corantes artificiais por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em pó de gelatina. **Quim. Nova**, v. 27, nº 1, 2004.

GÓES, A.J.S.; TENÓRIO, R.P.; LIMA, J.G.; FARIA, A.R.; ALVES, A.J.; AQUINO, T.M. Tiossemicarbazonas: métodos de obtenção, aplicações sintéticas e importância biológica. **Quím. Nova**, v. 28, nº 6, 2005.

GONÇALVES, A.L.; ALVES-FILHO, A.; MENEZES, H. Estudo comparativo da atividade antimicrobiana de extratos de algumas árvores nativas. **Arq. Inst. Biol.**, v. 72, n. 3, p. 353 - 358, 2005.

GOVIN, S.; PERES LAMAS, E.; CHAVEZ FIGUEREDO, A.M. Caracterización farmacognóstica de *Indigofera suffruticosa* Mill. (añil cimarrón). **Rev. Cubana de Plant. Med.**, v. 11, nº 3 - 4, 2006.

GRIMALDI, G. Jr.; TESH, R. B. Leishmaniasis of New World: Current concepts and implication for future research. **Clin. Microbiol.**, v. 6, p. 230 - 250, 1993.

GRYNBERG, N.F. Mecanismo de ação e atividade antitumoral de flavonóides, diterpenos e derivados mesoiônicos em tumores experimentais. Tese (Doutorado em Química Orgânica). UFRJ, 1999.

HAN, J. Traditional Chinese medicine and the search for new antineoplastic drugs. **J. Ethnopharmacol.**, v. 24, p. 1 - 17, 1988.

HAN, R. Highlight on the studies of anticancer drugs derived from plants in China. **Stem Cells**, v. 12, p. 53 - 63, 1995.

HAN, D-S., OH, S-K., OH, E-S. Selective cytotoxicities of phenolic acids in cancer cells. **J. Toxicol. Public Health**, v. 19, p. 45 - 50, 2003.

HANSEN, W.H.; FITZHUGH, O.G.; NELSON, A.A.; DAVIS, K.J. Chronic toxicity of two food colors, Brilliant Blue FCF and Indigotine. **Toxicol. And Applied Pharmacol.**, v. 8, nº 1, p. 29 - 36, 1966.

HANRAHAN, J.R.; CHEBIBI, M.; DAVUCHERON, N.L.M.; HALL, B.J.; JOHNSTON, G.A.R. Semisynthetic preparation of amentoflavone: a negative modulator at GABA_A receptors. **Bioorg. & Med. Chem. Letters**, v. 13, p. 2281 - 2284, 2003.

HARBONE, J.B.; WILLIAMS, C.A.; Advances in flavonoids research since 1992. **Phytochem.**, v. 5, p. 481 - 504, 2000.

HARBONE, J. B. London: Chapman and Hall, 676 p, 1996.

HARGREAVES, D.F.; POTTEN, C.S.; HARDING, C. Twoweek dietary soy supplementation has an estrogenic effect on normal premenopausal breast. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 84, nº 11, p. 4017 - 4024, 1999.

HART, J.A. Herbal Medicine.

Disponível em <http://www.umm.edu/altmed/ConsModalities/HerbalMedicinecm.html>
data de acesso: 01/01/2007.

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

HEREDIA, A.; DAVIS, C.; BAMBA, D.; LE, N.; GWARZO, M.Y.; SADOWSKA, M.; GALLO, R.C.; REDFIELD, R.R. Indirubin-3'-monoxime, a derivative of a Chinese antileukemia medicine, inhibits P-TEFb function and HIV-1 replication. **AIDS**, v. 19, n.º 18, p. 2087 - 2095, 2005.

HESBERT, A.; BOTTIN, M.C.; DE CEARRIZ, J.; PROTOIS, J.C.; CAVELIER, C. Testing natural indigo for genotoxicity. **Toxicol. Let.**, v. 21, p. 119 -125, 1984.

HOESSEL, R. et al. Indirubin, the active constituent of a Chinese antileukaemia medicine, inhibits cyclindependent kinases. **Nat. Cell Biol.**, v. 1, p. 60 - 67, 1999.

HOLETZ, F.B.; PESSONI, G.L.; SANCHES, N.R.; CORTEZ, D.A.G.; NAKAMURA, C.V.; DIAS FILHO, B.P.; Screening of some plants used in the brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 7, p. 1027 - 1031, 2002.

HOU, L.H.; JU, C.; ZHANG, J.; SONG, J.; GE, Y.; YUE, W. Antitumor effects of Isatin on human neuroblastoma cell line (SH-SY5Y) and the related mechanism. **Eur. J. Pharm.**, v. 589, p. 27- 31, 2008.

HUSSAR, D. A. New drugs. Part I, Nursing, v. 30, p. 55 – 62, 2000 a.

HUSSAR, D. A. New drugs. Part II, Nursing, v. 30, p. 55 – 62, 2000 b.

HWANG, E.Y.; HUH, J.W.; CHOI, M-M., CHOI, S.Y.; HONG, H-N.; CHO, S-W. Inhibitory effects of gallic acid and quercetin on UDP-glucose dehydrogenase activity. **FEBS Lett.**, v. 582, p. 3793 - 3797, 2008.

INCA - Instituto Nacional do Câncer. Ministério da Saúde, 2006. Estimativas da incidência e mortalidade por câncer no Brasil.

Disponível em: <http://www.inca.org.br/epidemiologia/estimativa2006/neoplasia.html>
data de acesso 15/01/2008.

INOUE, M.; SUZUKI, R.; KOIDE, T.; SAKAGUCHI, N.; OGIHARA, Y.; YABU, Y.; Antioxidant gallic acid induces apoptosis in HL-60RG cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 204, p. 898 - 904, 1994.

INNOCENTI, G.; VEGETO, E.; DALL'ACQUA, S.; CIANA, P.; GIORGETTI, M.; AGRADI, E.; SOZZI, A.; FICO, G.; TOMÉ, F. *In vitro* estrogenic activity of *Achillea millefolium* L. **Phytomed.**, v. 14, p. 147 - 152, 2007.

IWU, M.M.; JACKSON, J.E.; SCHUSTER, B.G. Medicinal plants in the Fight against Leishmaniasis. **Parasitol. Today**, v. 10, n.º 2, p. 65 - 68, 1994.

JAGAN, S.; RAMAKRISHMAN, G.; ANANDAKUMAR, P.; KAMARAJ, S., DEVAKI, T.; Antiproliferative potential of gallic acid against diethylnitrosamine-induced rat hepatocellular carcinoma. **Mol. Cell. Biochem.**, v. 319, p. 51 - 59, 2008.

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

- JI, X.J.; LIU, X.M.; LI, K.; et al. Pharmacological studies of meisoindigo: absorption and mechanism of action. **Biomed. Environ. Sci.**, v. 4, p. 332 - 337, 1991.
- JIMENÉZ, M.R.; SANCHÉZ, J.C.; MOHAMED ANALLA, M.; ANDRÉS MUÑOS-SERRANO, A.M.; MORAGA, A.A.; Genotoxicity and anti-genotoxicity of some traditional medicinal herbs. **Mut.Res/Gen. Toxicol. Env. Mut.**, v. 585, p.147 - 155, 2005.
- JOHN, P.; MACIAS, P.G. Formation of Natural Indigo Derived from Woad (*Isatis tinctoria* L.) in Relation to Product Purity. **J. Agric. Food Chem.**, v. 52, p. 7891 - 7896, 2004.
- JONGEN, W.M.; ALIMK, G.M. Enzyme-mediated mutagenicity in *Salmonella typhimurium* of contaminants of synthetic indigo products. **Food Chem. Toxicol.**, v. 20, nº 6, p. 917-920, 1982.
- JORGENSEN, J.H.; TURNIDGE, J.D.; WASHINGTON, J.A. Antibacterial susceptibility tests: dilution and disk diffusion methods. In: MURRAY, P.R. et al., *Manual of Clinical Microbiology*, 7 ed. Washington: American Society for Microbiology Press, 1999. cap. 118, p. 1526 - 1543.
- KANG, S.S.; LEE, J.Y.; CHOI, Y.K.; SONG, S.S.; KIM, J.S.; JEON, S.J.; HAN, Y.N.; SON, K.H.; HAN, B.H. Neuroprotective effects of naturally occurring biflavonoids. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 15, p. 3588 - 3591, 2005.
- KANG, M.S.; OH, J.S.; KANG, I.C.; HONG, S.J.; CHOI, C.H. Inhibitory effect of methyl gallate and gallic acid on oral bacteria. **J. Microbiol.**, v. 46, p. 744 - 750, 2008.
- KAYSER, O; KIDERLEN, A.F.; In vitro leishmanicidal activity of naturally occurring chalcones. **Phytot. Res.**, v.15, p. 141 - 152, 2001.
- KAYSER, O.; KIDERLEN, A.F.; CROFT, S.L. Natural Products as potential antiparasitic drugs. **S. Nat. Prod. Chem**, v. 26, p. 779 - 848, 2002.
- KAYSER, O.; OLBRICH, C.; VARDLEY, V.; KIDERLEN, A.F.; CROFT, S.L. Formulation of amphotericin B as nanosuspension for oral administration. **Int. J. Pharm.**, v. 254, p. 73 - 75, 2003.
- KIM, J.H.; LEE, B.K.; LEE, K.W.; LEE, H.J.; Resveratrol counteracts gallic acid-induced down-regulation of gap-junction intercellular communication. **J. Nutr. Biochem.**, 2008.
- KLARPIUK, I.A.; VOLKOVA, N.A.; OKUNEVA, L.A.; GOGOL', A.T.; RYBAKOVA, K.D. Mutagenic effect of the food-coloring agents tartrazine and indigo carmine. **Vopr. Pitan.**, v. 2, p. 58 - 61, 1984.
- KNIGHT, D.C.; EDEN, J.A. Phyto-oestrogens – a short review. **Maturitas**, v. 22, p. 167 - 175, 1995.
- KOIKE, S.; SAKAI, M. Molecular cloning and characterization of rat estrogen receptor cDNA. **Nucleic Acids Res.**, v. 15, nº 06, p. 2499 - 2513, 1987.
- KOŁODZIEJ, H.; KIDERLEN, A.F. Antileishmanial activity and immune modulatory effects of tannins and related compounds on *Leishmania* parasitized RAW 264.7 cells. **Phytochem.**, v. 66, p. 2056 - 2071, 2001.

- KRITCHEVSKY, D.; CHEN, S. C. Phytosterols - health benefits and potential concerns: A review. **Nutr. Res.**, v. 25, p. 413 - 428, 2005.
- KUNIKATA, T.; TATEFUJI, T.; AGA, H.; IWAKI, K.; IKEDA, M.; KURIMOTO, M. Indirubin inhibits inflammatory reactions in delay-type hypersensitivity. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 410, p. 93 -100, 2000.
- KVIST, L.P.O; CHRISTENSEN, S.B.; RASMUSSEN, A.B.; MEIJA, K.; GONZALEZ, A. Identification and evaluation of Peruvian plants used to treat malaria and leishmaniasis. **J. Ethnopharmacol.**, v. 4146, p. 1 - 13, 2006.
- LEE, J.S.; LEE, M.S.; OH, W.K.; YONG, JI. Fatty acid synthase inhibition by amentoflavone induces apoptosis and antiproliferation in human breast cancer cells. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 32, p. 1427 - 1432, 2009.
- LEVETIN, E.; MAHON, K.M.
Disponível em <http://highered.mcgraw-hill.com>
data de acesso 13/09/2007.
- LEITE, S.P.; SILVA, L.L.S.; CATANHO, M.T.J.A.; LIMA, E.O.; LIMA, V.L.M.; Antiinflammatory activity of *Indigofera suffruticosa* extract. **REBRASA**, v. 7, p. 47 - 52, 2003.
- LEITE, S.P.; MEDEIROS, P.L.; SILVA, E.C.; MAIA, M.B.S.; LIMA, V.L.M.; SAUL, D.E. Embryotoxicity *in vitro* with extract of *Indigofera suffruticosa* leaves. **Reprod. Toxicol.**, v. 18, p. 701 - 705, 2004.
- LEITE, S.P.; MEDEIROS, P.L.; VIEIRA, J.R.C.; LEITE, R.M.P.; LIMA, V.L.M.; XAVIER, H.S.; LIMA, E.O. Antimicrobial activity of *Indigofera suffruticosa*. **Adv. Acc. Publ.**, v. 3. nº 2, p. 261 - 265, 2006.
- LI, Y.L.; GAN, G.P.; ZHANG, H.Z.; WU, H.Z.; LI, C.L.; HUANG, Y.P; LIU, Y.W.; LIU, J.W. A flavonoid glycoside isolated from *Smilax china* L. rhizome *in vitro* anticancer effects on human cancer cell lines. **J. Ehtnopharmacol.**, v. 113, p. 115 - 124, 2007.
- LIBNOW, S.; METHLING, K.; HEIN, M.; MICHALIK, D.; HARMS, M.; WENDE, K.; FLEMMING, A.; KÖCKERLING, M.; REINKE, H.; BEDNARSKI, P.J.; LALK, M.; LANGER, P. Synthesis of indirubin-N0-glycosides and their anti-proliferative activity against human cancer cell lines. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 16, p. 5570 - 5583, 2008.
- 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. **J. Ethnopharmacol.**, v. 100, p. 127 -130, 2005.
- LIM, Y.H.; KIM, I.H.; SEO, J.J. In vitro activity of kaempferol isolated from the Impatiens balsamina alone and in combination with erythromycin or clindamycin against Propionibacterium acnes. **J. Microbiol.**, v. 45, nº 5, p. 473 - 477, 2007.
- LIU, X.M.; WANG, L.G.; LI H.Y.; JI, X.J. Induction of differentiation and down-regulation of c-myb gene expression in ML-1 human myeloblastic leukemia cells by the clinically effective anti-leukemia agent meisoindigo. **Biochem. Pharmacol.**, v. 51, p. 1545 - 1551, 1996.

- LOPES, F.C.M.; Avaliação da atividade imunológica *in vitro* de *Alchornea spp* quanto à produção de peróxido de hidrogênio, óxido nítrico e fator de necrose tumoral- α por macrófagos murinos. **Dissertação de Mestrado**, FCF/Unesp, SP – Brasil, 2004.
- LOPES, F.C.M.; Avaliação da atividade antiinflamatória, antitumoral e aniangiogênica de compostos isolados da planta *Alchornea glandulosa* e de fungos endofíticos a ela associados. **Tese de doutorado**, FCF/Unesp, SP – Brasil, 2008.
- LOPEZ, A.G.L.; PARRA, A.V.; RUIZ, A.R.; PILOTO, J. Estudio toxicogenético de um extrato fluido de *Ocimum basilicum* L. (*Albahaca blanca*). **Rev. Cubana Plant. Méd.**, v. 5, nº 3, p. 78 - 83, 2000.
- LOPEZ, A.; HUDSON, J.B.; TOWERS, G.H.N. Antiviral and antimicrobial activities of Colombian medicinal plants. **J. Ethnopharmacol.**, v. 77, p. 189 - 196, 2001.
- LORENZI, H. et al. Plantas Medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas. **Plantas Medicinais**. Nova Odessa, SP, Instituto Plantarum, 2002.
- LUCAS, V. Forma do Extrato Fluído. **Rev. Bras. Farm.**, 1941.
- 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. STEININGER, M. Estimativas de perda da área do cerrado brasileiro. **Relatório técnico não publicado: Conservação Internacional**, Brasília, 2004.
- 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. **Rev. Un. Rural**, Série Ciências Exatas e da Terra, v. 20, p. 17 - 34, 1998.
- MAK, N.; LEUNG, C.; WEI, X.; SHEN, X.; WONG, R.N.; LEUNG, K.; FUNG, M. Inhibition of RNATES expression by indirubin in influenza virus-infected human bronchial epithelial cells. **Biochem. Pharmacol.**, v. 67, p. 167 - 174, 2004.
- MARKO, D.; SCHATZLE, S.; FRIEDEL, A.; et al. Inhibition of cyclin-dependent kinase 1 (CDK1) by indirubinderivatives in human tumour cells. **Br. J. Cancer**, v. 84, p. 283 - 289, 2001.
- MARON, D.M.; AMES, B.N.; Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. **Mutat. Res.**, v. 113, n. 3 - 4, p. 173 - 215, 1983.
- MARQUES, V.R.B. Natureza em boiões: medicinas e boticários no Brasil setencista. Campinas, SP, Editora Unicamp, 1999.
- MARQUES, R.C.P.; MEDEIROS, S.R.B.; DIAS, C.S.; FILHO, J.M.B.; LIMA, L.F.A.; Evaluation of the mutagenic potential of yangambin and of the hydroalcoholic extract of *Ocotea duckei* by the Ames Test. **Mutat. Res.**, v. 536, p. 117 - 120, 2003.
- MARRIS, E. The forgotten ecosystem. **Nature**, v. 437, p. 944 - 945, 2005.
- MARTINI, N.D.; KATERERE, D.R.P.; ELOFF, J.N. Biological activity of five antibacterial flavonoids from *Combretum erythrophyllum* (Combretaceae). **J. Ethnopharmacol.**, v. 93, p. 207 - 212, 2004.

- MARTINS, E.R. et al. Plantas Mediciniais. Buscando a Saúde por meio das Plantas Mediciniais. Viçosa, MG, Editora UFV, 1994.
- MATOS, F.J.A. Plantas da Medicina Popular do Nordeste: Propriedades Atribuídas e Confirmadas. Fortaleza, PE, Editora UFC, 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. **Mut. Res.**, v. 467, p. 41 - 53, 2000.
- MASANNAT, Y.A; HANBY, A.; HORGAN, K.; HARDIE, L.J. DNA Damaging Effects of the Dyes Used in Sentinel Node Biopsy: Possible Implications for Clinical Practice. **J. Sir. Res.**, v., p. 1 - 5, 2009.
- MATHEUS, M.E.; VIOLANTE, F.A.; GARDEN, S.J.; PINTO, A.C.; FERNANDES, P.D.; Isatins inhibit cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase in a mouse macrophage cell line. **Eur. J. Phar.**, v. 556, p. 200 - 206, 2007.
- MBAVENG, A.T.; NGAMENI, B.; KUETE, V.; SIMO, I.K.; AMBASSA; P.; ROY, R.; BEZABIH, M.; et al. Antimicrobial activity of the crude extracts and five flavonoids from the twigs of *Dorstenia barteri* (Moraceae). **J. Ethnopharm.**, v. 116, p. 483 - 489, 2008.
- MEI, N.; HEFLICH, R.H.; CHOU, M.W.; CHEN, T. Mutations induced by the carcinogenic pyrrolizidine alkaloid riddelliine in the liver *cII* gene of transgenic big blue rats. **Chem. Res. Toxicol.**, v. 17, p. 814 - 818, 2005.
- MEIJER, L.; SHEARER, J.; BETTAYEB, K.; FERANDIN, Y. Diversity of the intracellular mechanisms underlying the anti-tumor properties of indirubins. **Intern. Congress Series**, v. 1304, p. 60 - 74, 2007.
- MENDES, C.C.; CRUZ, F.G.; DAVID, J.M.; NASCIMENTO, I.P.; DAVID, J.P. Triterpenos esterificados com ácidos graxos e ácidos triterpênicos isolados de *Byrsonima microphylla*. **Quím. Nova**, v. 22, p. 185 - 188, 1999.
- MICSICEK, R.J. Commonly occurring plant flavonoids have estrogenic activity. **Mol. Pharmacol.**, v. 44, p. 37 - 43, 1993.
- MICSICEK, R.J. Interaction of naturally occurring nonsteroidal estrogens with xpressed recombinant human estrogen receptor. **J. Steroid. Biochem. Biol.**, v. 49, n^os 2/3, p. 153 - 160, 1994.
- MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. Política Nacional da Biodiversidade. **Consolidação das Reuniões Regionais, versão preliminar**. Brasília, DF, 2002.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Política Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos. Ideal Editora, 1^a edição, Brasília, DF, 2006.
- MOGHADASIAN, M.H.; Pharmacological properties of plant sterols In vivo and in vitro observations. **Life Sciences**, v. 67, p. 605 - 615, 2000.
- MOL, M.C.N.; MONTALBÁN, E.B. Fitoestrógenos: possibilidades terapêuticas. **Rev. Fitoter.**, v.1, n.3, p. 165 - 180, 2001.

- MOREIRA, J. L. A.; AZEVEDO-TOZZI, A. N. G. **Rev. Bras. de Botânica**, v. 20, nº 1, p.97 - 117, 1997.
- MORTELMANS, K.; ZEIGER, E. The Ames *Salmonella*/Microsome Mutagenicity Assay. **Mut. Res.**, v. 455, p. 29 - 60, 2000.
- MOSQUETTE, R.; SIMÕES, M.J.; JÚNIOR, J.M.S.; SIMÕES, R.S.; SILVA, I.D.C.G.; CARVALHO, N.A.; BARACAT, E.C. Mecanismos Moleculares e Efeitos das Isoflavonas em Mulheres. **Arq. Bras. Fitom. Cient.**, v. 2, nº 1, p. 24 - 32, 2005.
- MOSELNANN, S.; POLMAN, J.; DIJKEMA, R. ER beta: identificação and characterization of a novel human estrogen receptor. **FEBS letts**, v. 392, nº 1, p. 49 - 53, 1996.
- MUELAS-SERRANO, S.; NOGAL-RUIZ, J.J.; GÓMEZ-BARRIO, A. Setting of a colorimetric method to determine the viability of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. **Parasitol. Res.**, v. 86., p. 999 - 1002, 2000.
- MURKIES, A.L.; WILCOX, G.; DAVIS, S.R. Phytoestrogens. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 83, p. 297 - 303, 1998.
- MUSONDA, C.C.; WHITLOCK, G.A.; WITTY, M.J.; BRUN, R.; KAISER, M. Synthesis and evaluation of 2-pyridyl pyrimidines with in vitro antiplasmodial and antileishmanial activity. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 19, p. 401 - 405, 2009.
- NATURAL HEALTH SCHOOL. Brief history of herbalism.
Disponível em http://www.naturalhealthschool.com/history_of_herbalism.html
data de acesso: 05/01/2008.
- NCCLS. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard - Sixth Edition. **NCCLS document M7-A6 (ISBN 1-56238-486-4)**. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003a.
- NCCLS. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard - Eighth Edition. **NCCLS document M2-A8 (ISBN 1-56238-485-6)**. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003b.
- NISHIZAWA, M.; YAMAGISHI, T.; DUTSCHMAN, G.E.; PARKER, W.B.; BODNER, A.J.; KILKUSKIE, R.E.; CHENG, Y-C.; LEE, K-H. Anti-AIDS agents: ¹ Isolation and characterization of four new tetragalloilquinic acids as a new class of HIV reverse transcriptase inhibitors from tannic acid. **J. Nat. Prod.**, v. 52, nº 4, p. 762 - 768, 1989.
- NONAKA, G-I.; NISHUOKA, I.; CHANG, J.J.; LEE, K.H. Antitumor agents, 129¹. Tannins and related compounds as selective citotoxic agents. **J. Nat. Prod.**, v. 55, nº 8, p. 1033 - 1043, 1992.
- OBERDÖRSTER, E.; CLAY, M.A.; COTTANI, D.M.; WILMOT, F.A.; MCLACHLAN, J.A.; MILNER, M.J. Common phytochemicals are ecdysteroid agonists and antagonists: a posible evolutionary link between vertebrate and invertebrate steroid hormones. **J. Steroid Biochem. & Mol. Biol.**, v. 97. p. 229 - 238, 2001.

OGATA, A.; HAMAUE, N.; TERADO, M.; MINAMI, M.; NAGASHIMA, K.; TASHIRO, K. Isatin, an endogenous MAO inhibitor, improves bradykinesia and dopamine levels in a rat model of Parkinson's disease induced by Japanese encephalitis virus. **J. Neur. Sci.**, v. 206, p. 79 - 83, 2003.

OH, S-M.; CHUNG, K-H.; Estrogenic activities of *Ginkgo biloba* extracts. **Life Sci.**, v. 74, p. 1325 - 1335, 2004.

OKAMOTO, T.; Safety of quercetin for clinical application (Review). **Mut.Res./Gen.Toxicol. Env. Mut.**, v. 585, p. 105 - 112, 2005.

OLEA, N.; PAZOS, P.; FERNÁNDEZ, M.F.; RIVAS, A.; OLEA-SERRANO, F.; PEDRAZA, V. Phyto and mycoestrogens (xenoestrogens) as a preventable cause of breast cancer. I. **J. Med. Biol. Environ.**, v. 27, nº1, p. 55 - 60, 1999.

O'LEARY, K.A.; TEREASA, S.P.; NEEDS, P.W.; BAO, Y.P.; O'BRIEN, N.M.; WILLIAMSON, G. Effect of flavonoids and Vitamin E on cyclooxygenase-2 (COX-2) transcription. **Mut. Res.**, v. 551, p. 245 -254, 2004.

OLIVEIRA, L.P.; PINHEIRO, R.C.; VALADARES, M.C. Avaliação da citotoxicidade da *Punica granatum* L. sobre células tumorais. **Rev. Eletron. Farmácia**, v. 2, nº 2, p. 150 - 152, 2005.

OLIVEIRA, V.M.; ALDRIGHI, J.M.; RINALDI, J.F.; Quimioprevenção do câncer de mama. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v. 52, p. 453 - 459, 2006.

OLIVEIRA, C.C. Fitoterapia, história e conhecimento.
Disponível em <http://www.eca.usp.br/nucleos/njr/voxscientiae/cassia14.html>
data de acesso 05/01/2008.

OZÇELIK, B.; ORHAN, I.; TOKER, G. Antiviral and antimicrobial assessment of some selected flavonoids. **Z. Natur.**, v. 61, nº 9 -10, p. 632 - 638, 2004.

PAIVA, M.A.S.; BARBOSA, A.C.D.; ALVES, H.L.J.; *Indigofera suffruticosa* Mill (Leguminosae) com potencial forrageiro em uma região de Caatinga no Semi-árido de Pernambuco (Alagoinha). **Proceedings of the XXXVIII Congresso Nacional de Botânica**, São Paulo, SP, SNB, p. 422, 1987.

PAN, X.; TAN, N.; ZENG, G.; ZHANG, Y.; JIA, R. Amentoflavone and its derivatives as novel natural inhibitors of human Cathepsin B. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 13, p. 5819 - 5825, 2005.

PANICHAYUPAKARANANT, P.; QIAN, B.; SIRIKATITHAM, A.; ZHANG, R.P.; GUO, Y.D.; WU, Y.Q. Determinación cuantitativa de indigotina e indirubina en el índigo natural mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC). **Ars. Pharm.**, v. 46, nº 4, p. 429 - 438, 2005.

PANIZZI, L.; CAPONI, C.; CATALANO, S.; CIONI, P.L.; MORELLI, I. *In vitro* antimicrobial activity of extracts and isolated constituents of *Rubus ulmifolius*. **J. Ethnopharmacol.**, v.79, p. 165 -168, 2002.

- PENNA, C.; MARINO, S.; VIVOT, E.; CRUAÑES, M.C.; MUÑOZ, J.D.; CRUAÑES, J.; FERRARO, G.; GUTKIND, G.; MARTINO, V. Antimicrobial activity of Argentine plants used in the treatment of infectious diseases. Isolation of active compounds from *Sebastiania brasiliensis*. *J. Ethnopharm.*, v. 77, p. 37-40, 2001.
- PEREIRA, E.R.T.; PAULA, R.J.; VALADARES, M.C. Investigação do potencial quimioprotetor da *Punica granatum*. **Ver. Eletron. Farmácia**, v. 2, nº 2, p. 168 -171, 2005.
- PEREIRA-SILVA, E.F.L.; SANTOS, J.E.; KAGEYAMA, P.Y.; HARDT, E. Florística e fitossociologia dos extratos arbustivo e aéreo de um remanescente de cerrado em uma unidade de conservação do Estado de São Paulo. **Rev. Bras. Botânica**, v. 27, nº 3, p. 533 - 544, 2004.
- PERVEZ, H.; IGBAL, M.S.; TAHIR, M.Y.; NASIM, F.U.; CHOUDHARY, M.I.; KHAN, K.M. In vitro cytotoxic, antibacterial, antifungal and urease inhibitory activities of some N4-substituted isatin-3-thiosemicarbazones. **J.Enz. Inh. Med. Chem.**, v. 26, nº 3, p. 848 - 854, 2008.
- PESSOA, C.; COSTA-LOTUFO, L.; LEYVA, A.; DE MORAES, M.E.A.; DE MORAES, M.O. Anticancer potential of Northeast Brazilian plants. *L. Mol. Nat. Prod.*, p. 197 – 211, 2006.
- PIERSEN, C.E. Phytoestrogens in Botanical Dietary Supplements: Implications for Cancer. **Integr. Cancer Ther.**, v. 2, nº 2, p. 120 - 138, 2003.
- PIMENTEL, F.O. Estudo da atividade antioxidante das frações de *Byrsonima crassa* e *Byrsonima fagifolia* (Malpighiaceae). **Dissertação de Mestrado**, IB – Unicamp, Campinas, SP – Brasil, 2004.
- POSER, G.L.V. *Rauvolfia sellowii* Müll. Arg.: análise química em espécie autêntica e comercializada. Determinação dos efeitos genotóxicos dos alcalóides em sistemas procariotos e eucariotos. **Caderno de Farmácia**, v. 3, nº 1 / 2, p. 90 - 93, UFRGS, 1987.
- POSER, G.L.V.; MONTANHA, J.A.; ROEHE, P.M.; SCHRIPISEMA, J.; CARGNIN, S.; VENTURI, C.R.; FRITZ, D. Herpes vírus inhibitory substances from *Hypericum connatum* Lam., a plant used in southern Brazil to treat oral lesions. **J. of Ethnopharmacol.**, v. 113, p. 517 - 520, 2007.
- PRICHARD, R.S.; HILL, A.D.K.; DIGKSTRA, B.; MCDERMOTT, E.W.; O'HIGGINS, N.J.; The chemoprevention of breast cancer. **British J. Surg.**, v. 90, p. 772 - 783, 2003.
- PUROHIT, A.; NEWMAN, S.P.; REED, M.J.; The role of cytokines in regulating estrogen synthesis implications for the etiology of breast cancer. **Breast Cancer Res.**, v. 4, p. 65 - 69, 2002.
- RADTKE, O.A.; KIDERLEN, A.F.; KAYSER, O.; KOLODZIEJ, H. Gene expression profiles of inducible nitric oxide synthase and cytokines in Leishmania major-infected macrophage like RAW 264.7 cells treated with gallic acid. **Plant. Med.**, v. 70, p. 924 – 928, 2004.
- RAINA, K.; RAJAMANICKAN, S.; DEEP, G.; SINGH, M.; AGARWAL, R.; ARGAWAL, C.; Chemopreventive effects of oral gallic acid feeding on tumor growth and progression in TRAMP mice. **Mol. Cancer Ther.**, v. 7, p. 1258 - 1267, 2008.

- RAJAPAKSE, N.; SILVA, E.; SCHOLZE, M.; KORTENKAMP, A. Deviation from additivity with estrogenic mixtures containing 4-nonylphenol and 4-tert-octylphenol detected in the E-SCREEN assay. **Environ Sci Technol.**, v. 38, p. 6343 - 6352, 2004.
- RANNUG, U.; BRAMSTEDT, H.; NILSSON, U. The presence of genotoxic and bioactive components in indigo dyed fabrics a possible health risk? **Mut. Res.**, v. 282, p. 219 - 225, 1992.
- RATES, S.M.K. Promoção do uso racional de fitoterápicos: uma abordagem no ensino de farmacognosia. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 1, nº 2, p. 57 - 69, 2001.
- RIBEIRO, C.A.F.; Justifica-se o uso de extractos de plantas medicinais na terapêutica da ansiedade e da depressão? **Artigos**, v. II, nº 4, 2000.
- RIBEIRO, A.; AIUB, C.; STANKEVICINS, L.; da COSTA, V.; FERREIRA, F.; MAZZEI, J.; MOURA, R.S.; FELZENSZWALB, I.; Genotoxic evaluation of a vinifera skin extract that present pharmacological activities. **Food and Chem.Toxicol.**, v. 42, p. 969 - 973, 2004.
- RIETJENS, I.M.C.M.; BOERSMA, M.G.; WOUDE, H.; JEURISSEN, S.M.F.; SCHUTTE, M.E.; ALINK, G.M.; Flavonoids and alkenylbenzenes: mechanisms of mutagenic action and carcinogenic risk. **Mut. Res.**, v. 574, p. 124 - 138, 2005.
- RIVERO-CRUZ, J.F.; ZHU, M.; KINGHORN, A.D.; WU, C.D. Antimicrobial constituents of Thompson seedless raisins (*Vitis vinifera*) against selected oral pathogens. **Phyto. Let.**, v. 1, p. 151 -154, 2008.
- ROCHA, L. G.; ALMEIDA, J. R. G. S.; MACÊDO, R. O.; FILHO, J. M. B. A review of natural products with antileishmanial activity. **Phytomed.**, v. 12, p. 414 - 435, 2003.
- ROCHA, L.G.; ALMEIDA, J.R.G.S.; MACÊDO, R.O.; BARBOSA-FILHO, J.M. A review of natural products with antileishmanial activity. **Phytomed.**, v. 12, p. 514 - 535, 2005.
- ROIG, J.R. Plantas medicinales aromáticas y venenosas de Cuba. La Habana, Editorial Ciencia y Técnica Instituto Del Libro, p. 315 – 316, 1974.
- ROSA LIMA, S.M.R. Fitomedicamentos na Prática Ginecológica e Obstétrica. São Paulo, SP, Atheneu, 2006.
- RUEFF, J.; LAIRES, A.; GASPARD, J.; BORBA, H.; RODRIGUES, A. Oxygen species and the genotoxicity of quercetin. **Mut. Res.**, vo 265, p. 75 - 81, 1992.
- RUITÓN, C.F.; PÉREZ, J.A.; PEÑA, D.A. Aislamiento e identificación de alcalóides mutagénicos de las hojas de *Ruta graveolens* L. por métodos espectroscópicos UV – IR. **Cien. e Investigación**, vo. 2, nº 2, 1999.
- SALUCCI, M.; STIVALA, L.A.; MAIANI, G.; BUGRANESI, R.; VANNINI, V. Flavonoids uptake and their effect on cell cycle of human colon adenocarcinoma cells (Caco2). **Br. J. Cancer**, v. 86, p. 1645 - 1651, 2002.
- SANNOMIYA, M. RODRIGUES, C.M.; COELHO, R.G.; SANTOS, L.C.; HIRUMA-LIMA, C.A.; BRITO, A.R.M.S.; VILEGAS, W. Application of preparative high-speed counter-current chromatography for the separation of flavonoids from the leaves of *Byrsonima crassa* Niedenzu (IK). **J. Chromat. A**, v. 1035, p. 47 - 51, 2004.

SANNOMIYA, M.; FONSECA, V.B.; SILVA, M.A.; ROCHA, L.R.M.; SANTOS, L.C.; HIRUMALIMA, C.A.; SOUZA-BRITO, A.R.M.; VILEGAS, W. Flavonoids and antiulcerogenic activity from *Byrsonima crassa* leaves extracts. *J. Ethnopharmacol.*, v. 97, p.1 - 6, 2005 a.

SANNOMIYA, M.; MONTORO, P.; PIACENTE, S.; PIZZA, C.; BRITO, A.R.M.S.; VILEGAS, W. Application of liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry to the analysis of polyphenolic compounds from an infusion of *Byrsonima crassa* Niedenzu. **Rapid Commun. Mass Spectrom.**, v. 19, 2244 - 2250, 2005 b.

SANNOMIYA, M.; CARDOSO, C.R.P.; FIGUEIREDO, M.E.; RODRIGUES, C.M.; SANTOS, L.C.; SANTOS, F.V.; SERPELONI, J.M.; CÓLUS, I.M.; VILEGAS, W.; VARANDA, E.A. Mutagenic evaluation and chemical investigation of *Byrsonima intermedia* A.Juss. leaf extracts. **J. Ethnopharm.**, v. 112, p. 319 - 326, 2007 a.

SANNOMIYA, M.; SANTOS, L.C.; CARBONE, V.; NAPOLITANO, A.; PIACENTE, S.; PIZZA, C.; SOUZA-BRITO, A.R.M.; VILEGAS, W. Liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry profiling of compounds from the infusion of **Byrsonima fagifolia** Niedenzu. **Rapid Commun. Mass Spectrom.**, v. 21, nº 8, p.1393 – 1400, 2007 b.

SANTOS, F.V. Avaliação da mutagenicidade *in vivo* e *in vitro* de compostos obtidos de plantas nativas do cerrado. **Tese de doutorado**, FCF - UNESP, Araraquara, SP, 2006.

SANTOS, F.V.; CÓLUS, I.M.S.; SILVA, M.A.; VILEGAS, W.; VARANDA, E.A. Assessment of the mutagenic potential of extracts and fractions of *Strychnos pseudoquina*, a Brazilian medicinal plant with antiulcerogenic activity. **Food Chem. Toxicol.**, v. 44, p. 1585 - 1589, 2006.

SAXENA, G.; MCCUTCHEON, A.R.; FARMER, S.; TOWERS, G.H.N.; HANCOCK, R.E.W. Antimicrobial constituents of *Rhus glabra*. **J. Ethnopharmacol.**, v. 42, p. 95-99, 1994.

SCHROEDER, T.M.F.A.; ABBRUZZESE, D.V.; GONZALEZ, C.B.; M-COLL, C.S.P. Um nuevo aporte a La toxicologia de colorantes alimentarios. Conjugación hepática de La indigotina com fosfolípidos. **Ver. Chil. Nutr.**, v. 32, nº 1, p. 1 - 8, 2005.

SCHULZ, V. et al. Fitoterapia Racional. Um guia de fitoterapia para as ciências da saúde. **Plantas Mediciniais, Fitomedicamentos e Fitoterapia**. Barueri, SP, Manole, 1ª edição brasileira, 2002.

SCIO, E.; FABRI, R.L.; NOGUEIRA, M.S.; BRAGA, F.G.; COIMBRA, E.S. *Mitracarpus frigidus* aerial parts exhibited potent antimicrobial, antileishmanial, and antioxidant effects. **Bior. Technol.**, v. 100, p. 428 - 433, 2009.

SEO, K.Y.; JELINSK, S.A.; LOECHLER, E.L.; Factors that influence the mutagenic patterns of DNS adducts from chemical carcinogens. *Mutation Res.*, v. 463, p. 217 – 246, 2000.

SHEN, P.; GUO, B.L.; GONG, Y.; HONG, D.Y.Q.; HONG, Y.; YONG, E.L. Taxonomic, genetic, chemical and estrogenic characteristics of *Epimedium* species. **Phytochem.**, v. 68, p. 1448 -1458, 2007.

- SHU, X.O.; JIN, F.; DAÍ, Q. Soyfood intake during adolescence and subsequent risk of breast cancer among Chinese women. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.**, v. 10, nº 5, p. 483 - 488, 2001.
- SILVA, G.; HEEBYUNG, C.; GUPTA, M.P.; FARNSWORTH, N.R.; CORDELL, G.A.; PEZZUTO, J.M.; BEECHER, C.W.W.; KINGHORN, A.D. Cytotoxic biflavonoids from *Selaginella willdenowii*. **Phytochem.**, v. 40, p. 129 - 134, 1994.
- SILVA, S.R.; SILVA, A.P.; MUNHOZ, C.B.; SILVA JR., M.C.; MEDEIROS, M.B. Guia de plantas do cerrado utilizadas na Chapada dos Veadeiros. WWW, Brasília, DF, 2001.
- 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 Chem. Toxicol.**, v. 40, p. 941 - 947, 2002.
- SILVA, W. W. A. A.; COLLHONE, M. C.; AYRES, D. C.; SOUTO, P. C. S.; GIORGIO, S. Effects of hyperbaric oxygen on *Leishmania amazonensis* promastigotes and amastigotes. **Paras. Intern.**, v. 54, p. 1 - 7, 2004.
- SILVA, J. G.; SOUZA, I. A.; HIGINO, J. S.; SIQUEIRA-JÚNIOR, J. P.; PEREIRA, J. V.; PEREIRA, M. S.; Atividade antimicrobiana de *Anacardium occidentale* Linn. em amostras multiresistentes de *Staphylococcus aureus*. **Ver. Bras. De Farmacognosia**, v. 17, nº 4, p. 1 - 5, 2007.
- SILVA JÚNIOR, A.A. **Essentia herba – Plantas bioativas**. Florianópolis, SC, Epagri, 2003.
- SIMÕES, C.M.O. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre, RS, Editora da UFRGS, 1999.
- SINGH, S.B.; AYERS, S.; ZINK, D.L.; MOHN, K.; POWELL, J.S.; BROWN, C.M.; MURPHY, T.; et al. Flavones from *Struthiola argentea* with anthelmintic activity *in vitro*. **Phytochem.**, v. 69, p. 541 - 545, 2008.
- SKEHAN, P. STORENG, R.; SCUDIERO, D.; MONKS, A.; MCMAHON, J.; VISTICA, D.; et al. New Colorimetric Cytotoxic Assay for Anticancer-Drug Screening. **J. Nat.Cancer Inst.**, v. 82, nº 13, p. 1107 - 1112, 1990.
- SOARES, V.C.G.; VARANDA, E.A.; RADDI, M.S.G. *In vitro* basal and metabolism-mediated cytotoxicity of flavonoids. **Food Chem. Toxicol.**, v. 44, p. 835 - 838, 2006.
- SOEJARTO, D.D. Biodiversity prospecting and benefit sharing: perspectives from the field. **J. of Ethnopharmacol.**, v. 51, p. 1 - 15, 1996.
- SOTO, A.M.; LIN, T.M.; JUSTICIA, H.; SILVIA, R.M.; SONNENSCHNEIN, C. An "in culture" bioassay to assess the estrogenicity of xenobiotics. In: Chemically-induced Alterations in Sexual Development: The Wildlife/Human Connection (Colborn T.; Clement, C., Eds). Princeton, N.J.: **Princeton Scientific Publishing**, p. 295 - 309, 1992.

- SOTO, AM.; MAFFINI, M.V.; SCHAEBERLE, C.M.; SONNENSCHNEIN, C. Strengths and weaknesses of "in vitro" assays for estrogenic and androgenic activity. **Best Prac. & Res. Clin. Endocrinol. & Metab.**, vol 20, nº 1, p. 15 - 33, 2006.
- SPEROFF, L.; FRITZ, M.A. Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility. Philadelphia, USA, Lippincott Williams & Wilkins, 2005.
- SREEPRIYA, M.; DEVAKI, T.; NAYEEN, M. Indian Journal of Physiology and Pharmacology, v. 25, nº 4, p. 428 - 434, 2001.
- SRIDHAR, S.K.; PANDEYA, S.N.; STABLES, J.P.; RAMESH, A. Anticonvulsant activity of hydrazones, Schiff and Mannich bases of isatin derivatives. **Eur. J. Pharm. Sci.**, v. 16, p. 129 -132, 2002.
- SRINIVAS, N.; PALNE, S.; NISHI; GUPTA, S.; BHANDARI, K. Aryloxy cyclohexyl imidazoles: A novel class of antileishmanial agents. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 19, p. 324 -327, 2009.
- STERITI, R. Nutritional Support for Chronic Myelogenous and other Leukemias: A Review of the Scientific Literature. **Alt. Med. Rev.**, v. 7, nº 5, 2002.
- STICHA, H.F.; ROSINA, M.P.; WUB, C.H.; POWRIE, W.D.A. A comparative genotoxicity study of chlorogenic acid (3-o-caffeoylquinic acid). **Mut. Res.**, v. 90, n. 3, p. 201-212, 1981.
- STROHEKER, T.; PICARD, K.; LHUGUENOT, J.C.; CANIVENC-LAVIER, M.C.; CHAGNON, M.C. Steroid activities comparison of natural and food wrap compounds in human breast cancer cell lines. **F. Chem. Toxicol.**, v. 42, p. 887 - 897, 2004.
- STEDMAN, C. Herbal hepatotoxicity. *Sem. Liver Dis.*, v. 22, nº 2, p. 195 - 206, 2002.
- SUN, X.Z.; ZHOU, D.; CHEN, S. Autocrine and paracrine actions of the breast tumor aromatase. A three-dimensional cell culture study involving aromatase transfected MCF7 and T-47D cells. **J. Steroid Biochem. Mol. Biol.**, v. 63, p. 29 - 36, 1997.
- SUSANTI, D.; SIRAT, H.M.; AHMAD, F.; ALI, R.M.; AIMI, N.; KITAJIMA, M. Antioxidant and cytotoxic flavonoids from the flowers of *Melastoma malabachricum* L. **Food Chem.**, v. 103, p. 710 - 717, 2007.
- TANG, W.; EISENBRAND, G. Chinese Drugs of Plant Origin. Chem., Pharmacol. and Use in Traditional and Modern Medicine, Springer, Heidelberg, 1994.
- TANIMURA, S.; KADOMOTO, R.; TANAKA, T.; ZHANG, Y.J.; KOUNO, T.; KOHNO, M.; Suppression of tumor cell invasiveness by hydrolyzable tannins (plant polyphenols) via the inhibition of matrix metalloproteinase-2-9 activity. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 330, p. 1306 - 1313, 2005.
- TAVARES, E.C.; SEGÓVIA, A.C.; PAULA, E.S. A família frente ao tratamento da criança com câncer: revisão de literatura. **Rev. Fafibe Online**, nº 3, 2007.
- 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. **Environ. and Mol. Mutag.**, v. 42, p. 144 -154, 2003.

THAM, D.M.; GARDNER, C.D.; HASKELL, W.L.; Potencial health benefits of dietary phytoestrogens: A review of the clinical, epidemiological and mechanistic evidence. **J.Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 83, p. 2223 - 2235, 1998.

TIERRAS, M. The Herbal Tradition.

Disponível em <http://www.planetherbs.com/articles/HerbHist.html>

data de acesso: 01/01/2008.

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

VARANDA, E.A.; POZETTI, G.L.; LOURENÇO, M.V.; VILEGAS, W.; RADDI, M.S.G.R. Genotoxicity of *Brosimum gaudichaudii* measured by the *Salmonella*/microsome assay and chromosomal aberrations in CHO cells. **J. Ethnopharmacol.**, v. 81, p. 257 - 264, 2002.

VARANDA, E.A. Atividade mutagênica de plantas medicinais. **Ver. De Ciênc. Farm. Básica e Aplic.**, v. 27, nº 1, p. 1 - 7, 2006.

VARELLA, S.D.; POZETTI, G.L.; VILEGAS, W.; VARANDA, E.A.; Mutagenic activity of sweepings and pigments of a household-was factory assayed with *Salmonella typhimurium*. **Food and Chemical Toxicol.**, v. 42, p. 2029 - 2035, 2004.

VEIGA JR., F.; PINTO, A.C.O. O Gênero *Copaifera* L. **Quím. Nova**, V. 25, nº 2, p. 273 - 286, 2002.

VIANA, M.E.S.; CARNEIRO, M.R.G.; FELZENSWALB, I.; PAUMGARTTEN, F.J.R.; Evaluation of β -myrcene and (+)-and (-)- α -pinene in the *Salmonella* /microsome assay. **Mut. Res/Genetic Toxicol. and Env. Mutagen.**, v. 557, p. 85 - 97, 2005.

VIEIRA, J.R.C.; NASCIMENTO, I.A.; LEITE, S.C.; *Indigofera suffruticosa*: an alternative anticancer therapy. **Evid. Based Complement. Alternat. Med.**, v. 1, p. 1 - 6, 2006.

VIEIRA, J.R.C. *Indigofera suffruticosa* Mill: um meio alternativo anti-câncer. **Dissertação de Mestrado**. UFPE, Centro de Ciências da Saúde, Recife, PE, 2007.

VILLALOBOS, M.; OLEA, N.; BROTONS, J.A.; OLEA-SERRANO, M.F.; RUIZ DE ALMODOVAR, J.F.; PEDRAZA, V. The E-screen assay: a comparison of different MCF7 cells stocks. **Environ. Health Perspect.**, v. 102, p. 844 - 850, 1995.

VINE, K.L.; LOCKE, J.M.; RANSON, M.; PYNE, S.G.; BREMNER, J.B. In vitro cytotoxicity evaluation of some substituted isatin derivatives. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 15, p. 931 - 938, 2007.

WAGNER, J.P.; ANTHONY, M.S.; CLINE, J.M.; Soy phytoestrogens: research on benefits and risks. **Clin. Obst. Gynecol.**, v. 44, p. 843 - 852, 2001.

WEI, H.; BOWEN, R.; CAI, Q. Antioxidant and promotional effects of soybean isoflavone genistein. **Proc. of the Soc, for Exp. Biol. and Med.**, v. 208, p. 124 - 130, 1995.

WENIGER, B.; ROBLEDO, S.; ARANGO, G. J.; DEHARO, E.; ARAGON, R.; MUÑOZ, V.; CALLAPA, J.; LOBSTEIN, A.; ANTON, R.; **J. Ethnopharmacol.**, v. 78, p. 193, 2001.

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 Chem. Toxicol.*, v. 40, p. 461 - 470, 2002.

WONG, M.B.; PÉREZ DE ALEJO, J.L.; PÉREZ FERNANDEZ, M.; RODRÍGUEZ, N.S. Actividad de la *Indigofera suffruticosa* Mill em La epilepsia crónica experimental y su relación com aminoácidos neurotransmisores. **Rev. Cub. de Plant. Med.**, v. 4, nº 1, 1999.

WOO, E.R.; CHAN-WOO, L.; HYUNJUNG, C.; HAN-SUNG, K.; DUCK-HEE, K.; et al. Biflavonoids isolated from *Selaginella tamariscina* regulate the expression of matrix metalloproteinase in human skin fibroblasts. **Bioorg. & Med. Chem.**, v. 16, p. 732 - 738, 2008.

WRIGHT, G.S.; GRUIDL, M.E. Early detection and prevention of lung cancer. **Curr. Opin. Onc.**, vol 12, p. 143 -148, 2000.

WU, L.M.; YANG, Y.P.; ZHU, Z.H.; Studies on the activity principles of *Indigofera tinctoria* in the treatment of CML. **Comm. Chinese Herbal Med.**, v. 9, p. 6 - 8, 1979.

WU, G.Y.; FANG, F.D.; Liu JZ, Chang A, Ho YH. Study on the mechanism of action of indirubin in the treatment of chronic granulocytic leukemia. I. Effect on nucleic acid and protein synthesis in human leukemic cells. **Chinese Med. J.**, v. 60, p. 451 - 454, 1980.

WUTTKE, W.; SEIDLOVÁ-WUTTKE, D.; GORKOW, C. The *Cimicifuga* preparation BNO. 1055 vs. Conjugated estrogens in a double-blind placebo-controlled study: effects on menopause symptoms and bone markers. **Manuritas**, v. 44, supl. 1:S67 - S77, 2003.

YANG, L.L.; LEE, C.Y.; YEN, K.Y.; Induction of apoptosis by hydrolyzable tannins from *Eugenia jambos* L. on human leukemia cells. **Cancer Lett.**, v. 157, p. 65 - 75, 2000.

YATABE, Y.; KONISHI, H.; MITSUDOMI, T.; NAKAMURA, S.; TAKAHASHI, T. Topographical distribution of allelic loss in individual non-small cell lung cancers. **Am. J. Phatol.**, v. 157, p. 985 - 993, 2000.

YUNES, R.A. et al. Fitofármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Quím. Nova**, V.24, nº1, São Paulo, SP, 2001.

YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B.; Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna. *Argos*, p. 523, 2001.

ZEIGER, E.; Mutagens that are not carcinogens: fault theory our fault tests? **Mutation Research Res.**, v. 492, p. 29 - 38, 2001.

ZHANG, S.X.; Studies on the chemical constituents of *Isatis indigotica* root. **Chin. Trad. Herb Drugs**, v. 14, p. 247 - 248, 1983.

ZHANG, A.; Qu, Y.; ZHANG, L.; ZENG, C.; PENG, J.; JI, X.; HOU, M.; ZHAO, Y. The different effects of indirubin on effector and CD4+CD25+ regulatory T cells in mice: potential implication for the treatment of autoimmune diseases. **J. Mol. Med.**, v. 85, nº 11, p. 1263 - 1270, 2007.

ZHANG, Y.; CHEN, A.Y.; LI, M.; CHEN, C; YAO, Q. *Ginkgo biloba* extract kaempferol inhibits cell proliferation and induces apoptosis in pancreatic cancer cells. **J. Surg. Res.**, v. 148, p. 17 - 23, 2008.

ZOECHLING, A.; REITER, E.; EDER, R.; WENDELIN, S.; LIEBNER, F.; JUNGBAUER, A. The flavonoid kaempferol is responsible for the majority of estrogenic activity in red wine. **Am. J. of Enol. Vitcult.**, v. 60, p. 222 - 232, 2009.

ARTIGOS

Original Article

Mutagenic Activity of *Indigofera truxillensis* and *I. suffruticosa* Aerial Parts

Tamara Regina Calvo^{1,*}, Cássia Regina Primila Cardoso^{2,*},
Adriana Candido da Silva Moura¹, Lourdes Campaner dos Santos¹,
Ilce Mara Syllos Colus³, Wagner Vilegas¹ and Eliana Aparecida Varanda²

¹Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química de Araraquara, UNESP – São Paulo State University, c.p. 355, CEP 14800-900, ²Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Ciências Biológicas, UNESP – São Paulo State University, CEP 14801-902, Araraquara, SP and ³Department of General Biology, Biological Sciences Center, UEL – Londrina State University, C.P. 6001, CEP 86051-990, Londrina, PR, Brazil

Indigofera truxillensis and *I. suffruticosa*, are used as a source of indigo dye and to treat several diseases. The mutagenic activity of the methanolic extracts from aerial parts, glycerolipid, flavonoid and alkaloid fractions of the extract were evaluated by means of *Salmonella*/microsome assays using TA100, TA98, TA102 and TA97a strains. The methanolic extract of *I. truxillensis* showed mutagenic activity in the TA98 strain without S9 while glycerolipid fraction was devoid of activity. The flavonoid and alkaloid fractions of both plants showed mutagenicity. Chemical analysis of flavonoid fractions of *I. truxillensis* and *I. suffruticosa* resulted in the identification of kaempferol, quercetin and their derivatives. The alkaloid fraction of both the species contained indigo and indirubin and indigo was found mainly responsible for the mutagenic activity.

Keywords: alkaloid – flavonoid – indigo – indirubin – mutagenicity

Introduction

Indigofera truxillensis and *I. suffruticosa* (family Fabaceae) are common plants of the Brazilian savannah. The genus *Indigofera* is known to be a rich source of flavonoid glycosides (1,2) and indigo derivatives (bis indoles) (3) and nitro compounds (4). *Indigofera truxillensis* Kunth is reported to be antiulcerogenic and anti-oxidant (5,6). *Indigofera suffruticosa* Miller is used as a source of indigo dye and in popular medicine as an anti-microbial, purgative, anti-spasmodic, sedative, diuretic, to treat epilepsy, stomach and urinary diseases, jaundice,

ulcers, intermittent fevers, hepatitis, as an antidote for snake venom and bee bites and to stimulate the central nervous system (7). Recently it was found highly effective in inhibiting growth of solid tumors (8) and showed anti-bacterial and antifungal activities (9).

Investigation of traditionally used medicinal plants is thus valuable as a source of potential chemotherapeutic drugs and as a measure of safety for the continued use. Plants are used to treat various ailments, however, some medicinal plants can be with serious risks to humans health (10). The *Salmonella* mutagenicity test (Ames test) identify if any sample provoke the mutation of genetically modified DNA of selected *S. typhimurium* strains and is used worldwide as an initial screening of the mutagenic potential of new chemicals for hazard identification and for the registration or acceptance of new chemicals by regulatory agencies (11,12).

*These authors contributed equally to this work.

For reprints and all correspondence: Eliana Aparecida Varanda, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara-UNESP, Departamento de Ciências Biológicas, Rodovia Araraquara Jau Km 1, s/n. CEP 14801-902, Araraquara, SP, Brazil. Tel: +55-016-3301-6951; Fax: +55-016-3301-6940; E-mail: varandae@fcar.unesp.br

© 2009 The Author(s).

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/2.0/uk/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

In spite of the many beneficial actions of plants, it is important to emphasize that some of their constituents can be poisonous to the organism, and metabolism of ingested plants can also generate toxic metabolites. Many carcinogens remain inactive until they are enzymatically transformed to an electrophilic species that is capable of covalently binding to DNA, leading to mutation. For this reason, metabolic activation is considered to be a critical step in mutagenesis (13–16).

Short-term tests that detect genetic damage can provide information needed to evaluate carcinogenic risks of chemicals to humans. The Ames test, recommended for testing the mutagenicity of chemical compounds with potential pharmacological application (12,17), was used in the present study to evaluate the putative mutagenic effect of the methanolic extracts of *I. truxillensis*, *I. suffruticosa*, flavonoid and alkaloid fractions including indigo and indirubin.

Methods

Chemicals

Dimethylsulfoxide (DMSO), nicotinamide adenine dinucleotide phosphate sodium salt (NADP), D-glucose-6-phosphate disodium salt, L-histidine monohydrate, D-biotin, standard mutagens: sodium azide, 2-anthramine, mitomycin C and 4-nitro-*o*-phenylenediamine were purchased from Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, USA). All other reagents used for chemical analysis and to prepare buffers and media were from Merck (Whitehouse Station, NJ) and Sigma.

Plant Material

Aerial parts of plants were collected in Rubião Junior, Botucatu city, São Paulo State, Brazil, and authenticated by Prof. Dr Jorge Yoshio Tamashiro. The voucher specimens of *I. suffruticosa* Miller (HUEC 129598) and *I. truxillensis* Kunth (HUEC 131827) were deposited at the Herbarium of the Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), Campinas, SP, Brazil.

Extraction and Isolation

Air-dried aerial parts of the plants (1.5 kg) were powdered, extracted with chloroform (CHCl₃) and methanol (MeOH) successively at room temperature (3 × 72 h, each solvent). Solvents were filtered and evaporated at 35°C under reduced pressure, affording the CHCl₃ and MeOH extracts, respectively. *Indigofera truxillensis* yielded 43.0 g (2.9%) of CHCl₃ and 110.0 g (7.3%) of MeOH extract, while *I. suffruticosa* furnished 18.5 g (1.2%) of CHCl₃ and 41.3 g (2.7%) of MeOH extract. The MeOH extracts of both *Indigofera* species were fractionated in analogous

ways by gel permeation chromatography. An aliquot of the MeOH extract of the each plant (2.8 g) was subjected to column chromatography on Sephadex LH-20 (~130 fractions of 20 ml), using methanol as eluent, flowing at 0.5 ml/min. The collected fractions were combined into fractions A–C, after thin layer chromatography (TLC) analysis on silica-gel TLC plates on glass (20 × 20 cm), run with a solvent mixture composed of butanol:acetic acid:water (4:1:2, v:v:v), visualized by UV light (254 and 365 nm) and then sprayed with diphenylaminoborate/polyethyleneglycol (NP/PEG) reagent or anisaldehyde/sulfuric acid solution to develop the spots (18).

Fraction A, obtained from the MeOH extracts of each species of *Indigofera*, was analyzed by direct injection ESI-IT-MS/MS (electrospray ionization ion trap tandem mass spectrometry), which demonstrated that this fraction contained glycerolipids. Fraction B, denominated the flavonoid fraction, was purified by column chromatography on polyvinylpyrrolidone, eluted with MeOH and MeOH:water (80:20, v:v), or MPLC (medium-pressure liquid chromatography) on silica-gel, eluted with EtOAc:MeOH under gradient conditions, followed by semi-preparative reversed-phase HPLC on C-18 silica-gel, eluted with MeOH:water (80:20; 60:40, v:v). The purification of the fraction B from *I. truxillensis* and *I. suffruticosa* afforded flavonol derivatives of kaempferol and quercetin, respectively.

Fraction C, denominated the alkaloid fractions, obtained from the MeOH extracts of *I. truxillensis* and *I. suffruticosa*, was chromatographed by Sephadex LH-20 column and exhibited bis-indole alkaloids. Where necessary, fractionation of the MeOH extracts was repeated to obtain larger quantities of fractions B (flavonoid fraction) and C (alkaloid fraction). Compounds in fractions B and C were identified by MS (mass spectrometry), 1D and 2D NMR (nuclear magnetic resonance) techniques and confirmed by comparing the physical and spectroscopic/spectrometric data (NMR and MS) with those in the literature.

General Experimental Procedures

NMR spectra were obtained on a Varian Inova-500 NMR spectrometer using the solvent DMSO-*d*₆ with tetramethylsilane as internal standard. Electrospray ionization mass spectrometry was performed in a Fisons VG Platform instrument in the negative mode (45 V). The samples were dissolved in methanol and injected directly into the mass spectrometer through a Rheodyne injector. Acetonitrile was used as solvent and nitrogen was used as the drying gas and for nebulization. The analyses by ESI-IT-MS/MS were performed in a Finnigan (Thermo Finnigan, San Jose, CA, USA) LCQ Deca ion trap instrument equipped with Xcalibur software; samples were dissolved in methanol and infused in the electrospray

ionisation source with a syringe pump. Precoated silica-gel plates with aluminum-backed sheets (Merck) were employed for TLC with detection at 254 and 365 nm followed by color development with NP/PEG reagent or anisaldehyde/sulfuric acid reagent. Sephadex LH-20 columns (25–100 μm , 3.0 (i.d.) \times 57.0 and 1.5 (i.d.) \times 30 cm, Pharmacia Fine Chemicals), polyvinylpyrrolidone (P-6755, Sigma) and silica-gel SiF254 (0.063–0.200 mm, Merck) were used for column chromatography. The MPLC separations were carried out with a Baeckström apparatus equipped with an FMIQSY lab pump, using a silica-gel column [0.04–0.063 mm, 2.0 (i.d.) \times 30 cm, Merck]. Fractions were purified by HPLC in a system equipped with an R401 refractive index detector and with a Phenomenex Luna reversed-phase C-18 column [10 mm, 1.0 (i.d.) \times 25 cm, Phenomenex Luna] and Rheodyne injector with a 100 μl sample loop.

S. typhimurium Mutagenicity Assay

It was performed by preincubating test compounds for 20–30 min with the *S. typhimurium* strains TA100, TA98, TA97a and TA102, with or without metabolic activation (11). The S9-mix was freshly prepared before each test with an Aroclor-1254-induced rat liver fraction purchased (lyophilized) from Moltax (Molecular Toxicology Inc.). *Salmonella typhimurium* strains were kindly provided by Dr B. Ames, University of California, Berkeley, CA, USA. Various concentrations of the dry MeOH extract (1.25–7.5 mg/plate), the flavonoids fraction (0.12–2.5 mg/plate), alkaloids fraction (0.12–2.5 mg/plate) and isolated compounds (indigo and indirubin: 0.125–1.0 mg/plate) all dissolved in DMSO, were used. The concentrations used were based on the bacterial toxicity, 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 lawn. The various concentrations of tested compounds were added to 500 μl of buffer (pH 7.4) and 100 μl of bacterial culture and then incubated at 37 °C for 20–30 min. Next, 2 ml of top agar was added to the mixture and the whole poured on to a plate containing minimum agar. The plates were incubated at 37 °C for 48 h and the his⁺ revertant colonies were counted manually. The influence of metabolic activation was tested by adding 500 μl of S9 mixture (4%) in place of the buffer. All experiments were analyzed in triplicate.

The standard mutagens used as positive controls in experiments without S9 mix were 4-nitro-*o*-phenylenediamine (10 μg /plate) for TA98 and TA97a, sodium azide (1.25 μg /plate) for TA100 and mitomycin C (0.5 μg /plate) for TA102. 2-anthramine (0.125 μg /plate) was used in the

experiments with metabolic activation with all strains. DMSO served as the negative (solvent) control.

Statistical analysis

The statistical analysis was performed with the Salanal computer program, adopting the Bernstein *et al.* (19) model. The mutagenic index (MI) was also calculated for each dose, as 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 $\text{MI} \geq 2$ for at least one of the tested doses and if the response was dose dependent (20–22).

Results

Phytochemical Analysis

Portions of the MeOH extracts from *I. truxillensis* and *I. suffruticosa* were fractionated by gel permeation on Sephadex LH-20, leading to the collection of fractions A–C. Fraction A from both species contained glycerolipids.

The purification of fraction B (flavonoid fraction) from *I. truxillensis* yielded the flavonols: kaempferol 3-*O*- α -L-rhamnopyranoside (It1, 9 mg) and kaempferol 7-*O*- α -L-rhamnopyranoside (It2, 7 mg), kaempferol 3-*O*- α -L-rhamnopyranoside-7-*O*- α -L-rhamnopyranoside (It3, 21 mg), kaempferol 3-*O*- α -L-arabinopyranoside-7-*O*- α -L-rhamnopyranoside (It4, 15 mg). The flavonoid fraction from *I. suffruticosa* was also purified, affording the flavonols quercetin 7-*O*- β -D-glucopyranoside (Is1, 5 mg), quercetin 3-*O*-[β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-galactopyranoside] (Is2, 10 mg), quercetin 3-*O*-[α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranoside] (Is3, 20 mg), quercetin 3-*O*-[β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopyranoside] (Is4, 8 mg). Purification of fraction C (alkaloid fraction) from *I. truxillensis* and *I. suffruticosa* gave the same bis-indole derivatives: indigo (It5, 5 mg; Is5, 7 mg) and indirubin (It6, 8 mg; Is6, 5 mg) (Fig. 1).

Salmonella Mutagenicity Assay

The MeOH extract as well as the fractions and some isolated compounds were investigated for their mutagenic activity, using the *Salmonella* microsome assay. Table 1 shows the number of revertants/plate, the SD and the MI values after the treatments with the extracts and fractions of *I. truxillensis*, in the four different strains of *S. typhimurium*, with or without metabolic activation. The MeOH extract was mutagenic to the strain TA98 in absence of metabolic activation (–S9) and in presence of S9 TA98 did not display mutagenicity. This strain detects frameshift mutations in the DNA (target –C–G–C–G–C–G–). The mutagenic indexes per plate

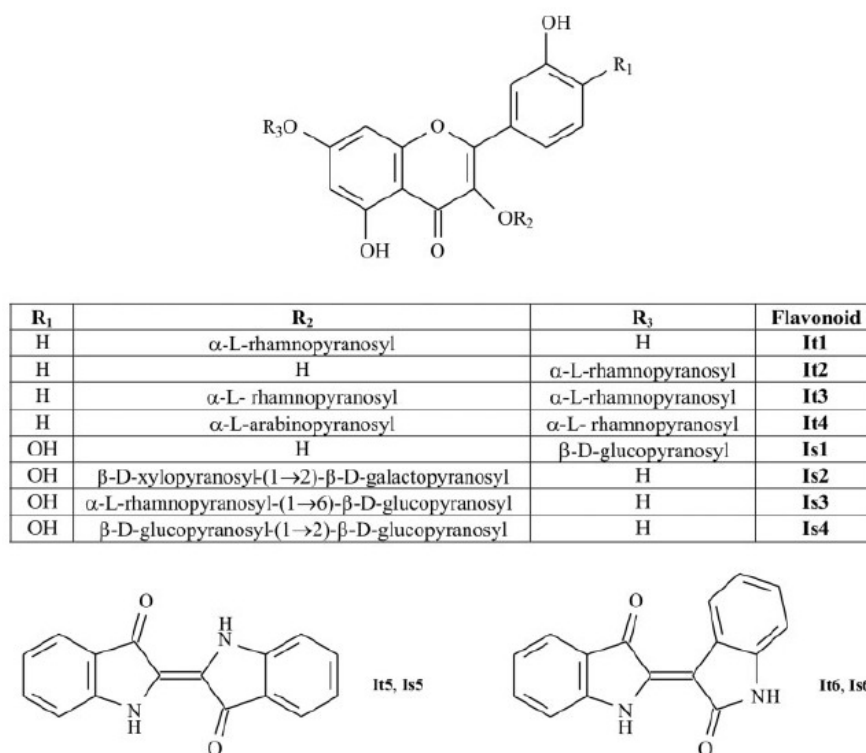


Figure 1. Structures of the compounds isolated from the *Indigofera* species. Fraction B (Flavonoid fraction): *I. truxillensis*—kaempferol 3-*O*- α -L-rhamnopyranoside (It1) and kaempferol 7-*O*- α -L-rhamnopyranoside (It2), kaempferol 3-*O*- α -L-rhamnopyranoside-7-*O*- α -L-rhamnopyranoside (It3) and kaempferol 3-*O*- α -L-arabinopyranoside-7-*O*- α -L-rhamnopyranoside (It4); *I. suffruticosa*—quercetin 7-*O*- β -D-glucopyranoside (Is1), quercetin 3-*O*-[β -D-xylopyranosyl-(1→2)- β -D-galactopyranoside] (Is2), quercetin 3-*O*-[α -L-rhamnopyranosyl-(1→6)- β -D-glucopyranoside] (Is3) and quercetin 3-*O*-[β -D-glucopyranosyl-(1→2)- β -D-glucopyranoside] (Is4). Fraction C (Alkaloid fraction): *I. truxillensis* and *I. suffruticosa*—indigo (It5, Is5) and indirubin (It6, Is6).

observed for the strain TA98 were higher than the other strains used. Fraction A did not display any mutagenicity and it was not further investigated. Fraction B (flavonoid fraction) showed signs of mutagenic activity to the strain TA98 (−S9 and +S9). The values of the MI varied from 1.1 to 1.9, with a significant dose-dependent effect ($P \leq 0.01$). Fraction C (alkaloid fraction) also showed signs of mutagenic activity, with MI 1.7 and $P \leq 0.05$. These results suggested that the compounds in the methanol extract that induced mutagenic activity were present in fractions B and C.

Table 2 shows the results obtained with the MeOH extract of *I. suffruticosa* and in spite of the negative results in the mutagenic activity, the MI values are around 2 (TA98-S9), suggesting the presence of compounds potentially mutagenic. For the fractions A, B and C the results are similar to those obtained for *I. truxillensis*. The isolated compounds (from Fraction C) were evaluated and it can be seen in Table 3 that for indigo and indirubin the mutagenicity was positive. A significant increase in the reversion frequency of the TA98 strain was observed for indigo with and without addition of the S9 mixture and for indirubin the mutagenic effect was observed in absence of metabolism.

The highest MI value (7.7) was observed for indigo in presence of S9 fraction.

Discussion and Conclusions

Plants of the genus *Indigofera* are known for their efficacy in popular medicine. Although much work has been done on the pharmacological properties of extracts from species belonging to the genus, no data are available in the literature concerning the genotoxicity of *I. truxillensis* and *I. suffruticosa* that might guarantee the safe use of these medicinal plants.

The present study, mutagenic activity assays with *Salmonella* demonstrated that the methanol extract of *I. truxillensis* induced mutagenic activity in the TA98 strain, flavonoid and alkaloid fractions induced a significant increase in the number of revertants per plate, although MI was < 2 . The methanol extract and fractions of *I. suffruticosa* also induced a significant increase in the number of revertants per plate and the MI values are around 2, indicating signs of mutagenic activity. The phytochemical investigation showed that the flavonoids in the methanol extracts are kaempferol and quercetin glycosides.

Table 1. Mutagenic activity expressed as the mean and SD of the number of revertants/plate in bacterial strains TA98, TA100, TA97a and TA102 exposed to MeOH extract and fractions A, B and C of *I. truxillensis* at various doses, with (+S9) or without (−S9) metabolic activation

Treatments mg/plate	Revertants/plate in <i>S. typhimurium</i> strains							
	TA98		TA97a		TA100		TA102	
	−S9 ^a	+S9 ^b	−S9 ^a	+S9 ^b	−S9 ^c	+S9 ^b	−S9 ^d	+S9 ^b
MeOH extract								
0	43 ± 2.7	36 ± 2.0	131 ± 1.5	139 ± 2.5	163 ± 4.2	145 ± 9.5	242 ± 9.2	223 ± 11.9
1.25	55 ± 4.6* (1.3)	41 ± 2.3 (1.1)	143 ± 5.0 (1.1)	131 ± 2.5 (0.9)	184 ± 8.7 (1.1)	151 ± 14.5 (1.0)	271 ± 4.0 (1.1)	219 ± 7.9 (0.9)
2.50	57 ± 1.5** (1.3)	38 ± 7.6 (1.1)	143 ± 3.1 (1.1)	129 ± 10.7 (0.9)	186 ± 7.6 (1.1)	145 ± 3.0 (1.0)	254 ± 1.5 (1.0)	223 ± 11.0 (1.0)
3.75	87 ± 2.0** (2.0)	42 ± 2.0 (1.3)	147 ± 2.1 (1.1)	137 ± 6.8 (0.9)	194 ± 4.0 (1.2)	149 ± 11.9 (1.0)	258 ± 1.0 (1.1)	238 ± 6.7 (1.1)
5.00	77 ± 6.1** (1.8)	45 ± 4.2 (1.3)	148 ± 5.0 (1.1)	142 ± 16.1 (1.0)	180 ± 6.2 (1.1)	141 ± 7.6 (0.9)	264 ± 4.0 (1.1)	228 ± 5.3 (1.0)
7.50	75 ± 5.0** (1.7)	51 ± 3.1 (1.4)	159 ± 7.8 (1.2)	134 ± 16.0 (0.9)	173 ± 5.0 (1.1)	140 ± 5.5 (0.9)	280 ± 35.6 (1.2)	249 ± 11.0 (1.1)
Fraction A (glycerolipids)								
0	29 ± 2.1	31 ± 2.7	141 ± 8.0	143 ± 4.0	148 ± 2.5	143 ± 5.0	239 ± 16.7	210 ± 11.1
0.12	38 ± 4.6 (1.3)	31 ± 3.6 (1.0)	143 ± 13.5 (1.0)	137 ± 5.3 (0.9)	163 ± 26.1 (1.1)	155 ± 4.2 (1.1)	267 ± 14.1 (1.1)	235 ± 13.1 (1.1)
0.38	32 ± 5.3 (1.1)	30 ± 1.5 (0.9)	138 ± 4.6 (0.9)	143 ± 4.0 (1.0)	151 ± 4.2 (1.0)	149 ± 7.0 (1.0)	247 ± 7.6 (1.0)	236 ± 10.3 (1.1)
0.75	42 ± 13.5 (1.4)	40 ± 4.5 (1.3)	132 ± 7.8 (0.9)	148 ± 3.6 (1.0)	164 ± 13.9 (1.1)	165 ± 13.6 (1.2)	245 ± 5.9 (1.0)	251 ± 5.1 (1.2)
1.50	39 ± 5.6 (1.3)	35 ± 3.6 (1.1)	144 ± 8.4 (1.0)	138 ± 7.6 (0.9)	183 ± 14.1 (1.2)	166 ± 3.1 (1.2)	250 ± 6.1 (1.0)	254 ± 5.6 (1.2)
2.50	40 ± 4.1 (1.4)	39 ± 6.0 (1.3)	138 ± 4.6 (0.9)	143 ± 6.1 (1.0)	173 ± 10.1 (1.2)	175 ± 7.6 (1.2)	251 ± 6.9 (1.0)	255 ± 7.2 (1.2)
Fraction B (flavonoids)								
0	29 ± 2.1	31 ± 2.7	141 ± 8.0	143 ± 4.0	148 ± 2.5	143 ± 5.0	239 ± 16.7	210 ± 11.1
0.12	32 ± 4.0 (1.1)	30 ± 5.9 (0.9)	142 ± 20.0 (1.0)	145 ± 7.9 (1.0)	144 ± 14.2 (0.9)	145 ± 4.2 (1.0)	223 ± 11.0 (0.9)	224 ± 6.0 (1.1)
0.38	40 ± 2.5* (1.4)	40 ± 8.7 (1.3)	132 ± 7.0 (0.9)	142 ± 3.1 (0.9)	140 ± 1.5 (0.9)	145 ± 6.5 (1.0)	198 ± 12.5 (0.8)	206 ± 11.4 (0.9)
0.75	42 ± 4.0** (1.4)	40 ± 7.5 (1.3)	138 ± 3.6 (0.9)	146 ± 5.1 (1.0)	145 ± 13.2 (0.9)	156 ± 12.4 (1.1)	213 ± 23.3 (0.9)	216 ± 17.1 (1.0)
1.50	50 ± 4.9** (1.7)	49 ± 6.4* (1.6)	156 ± 9.3 (1.1)	146 ± 5.9 (1.0)	155 ± 5.0 (1.0)	154 ± 6.5 (1.1)	246 ± 7.4 (1.0)	232 ± 13.6 (1.1)
2.50	57 ± 5.0** (1.9)	49 ± 4.6* (1.6)	158 ± 3.2 (1.1)	151 ± 7.8 (1.1)	136 ± 4.6 (0.9)	142 ± 7.9 (0.9)	250 ± 8.5 (1.0)	234 ± 11.0 (1.1)
Fraction C (alkaloids)								
0	43 ± 2.7	36 ± 2.0	131 ± 1.5	139 ± 2.5	163 ± 4.2	145 ± 9.5	242 ± 9.2	223 ± 11.9
0.12	37 ± 4.0 (0.9)	33 ± 5.0 (0.9)	133 ± 4.5 (1.0)	126 ± 6.6 (0.9)	165 ± 3.6 (1.0)	132 ± 3.1 (0.9)	241 ± 7.1 (0.9)	220 ± 4.5 (0.9)
0.38	43 ± 2.5 (1.0)	36 ± 6.0 (1.0)	146 ± 7.0 (1.1)	136 ± 9.1 (0.9)	178 ± 3.1 (1.1)	142 ± 2.0 (0.9)	256 ± 21.6 (1.1)	224 ± 9.9 (1.0)
0.75	44 ± 1.5 (1.0)	34 ± 11.1 (0.9)	136 ± 8.6 (1.0)	133 ± 4.5 (0.9)	183 ± 4.0 (1.1)	144 ± 4.6 (0.9)	294 ± 12.9 (1.2)	223 ± 14.1 (1.0)
1.50	72 ± 9.7* (1.7)	45 ± 3.1 (1.3)	152 ± 13.1 (1.2)	146 ± 4.0 (1.1)	189 ± 3.5 (1.1)	141 ± 10.0 (0.9)	310 ± 2.0 (1.3)	224 ± 11.2 (1.0)
Control +	608 ± 71.52	663 ± 35.4	711 ± 12.1	761 ± 28.0	914 ± 17.6	886 ± 49.3	1076 ± 57.1	1082 ± 72.9

MeOH: methanolic extract; 0 = negative control (DMSO—100 µl/plate); Control +: Positive control.

^a4-Nitro-*o*-phenylenediamine (10.0 µg/plate); ^b2-anthramine (1.25 µg/plate); ^cSodium azide (1.25 µg/plate); ^dMitomycin C (0.5 µg/plate).

P* < 0.05, *P* < 0.01 (ANOVA). The values in brackets are MI values.

In the case of the flavonoids, despite many results indicating their pharmacological activity and potential benefit to human health (23,24), several are also described as mutagens (25,26). Among flavonoids, flavonols constitute a very important subclass as for as genotoxicity studies are concerned. There are numerous reports on the mutagenicity of compounds belonging to this subclass. Quercetin is known to be directly mutagenic to the *Salmonella* strain TA98 (27–30), whereas flavonoids lacking the adjacent hydroxyl (catechol groups) are innocuous (31). Kaempferol has only one hydroxyl group in the B ring and is a weak mutagen in both TA98 (27–30) and V79 (32) cells, and this activity is decreased further when the aglycone is bound to glycosidic moieties (33).

The indigoids are natural bis-indoles utilized in dyes (34) and are being studied for medicinal purposes (35). They are founded in plants (36), mushrooms (37) and human urine (38). In the human body, indole is a product of the catabolism of tryptophan by gut bacteria and is significantly absorbed. It is oxidized to indoxyl and excreted in the urine as indoxyl

(3-hydroxyindole) sulfate. Many alkaloids are known to be genotoxic (39–43). However, many of these alkaloids have also demonstrated an outstanding pharmacological potential, exhibiting antimicrobial, antiplasmodial and antitumoral activities (44, 45).

In relation to indigo mutagenicity the data are controversial. Herbert *et al.* (46) assessed the mutagenicity of natural indigo by using the standard procedure for the *Salmonella*/microsome mutagenicity test, as described by Ames. The substance exhibited mutagenicity towards strains TA1538 and TA98 in the presence of S9. On the other hand, Jongen and Alink (47) investigated the mutagenic potential of two natural and seven synthetic, commercial indigo dye products. The natural products showed no mutagenicity in *S. typhimurium* strains TA98 and TA100. The results confirmed the presence of mutagenic activity and the highest values of MI were obtained when indigo was evaluated, suggesting that this alkaloid is the main compound responsible for the mutagenic effect. Natural indigo is a dark blue powder obtained from several plant species, besides the gender *Indigofera* (48). It is used in Chinese traditional medicine (49)

Table 2. Mutagenic activity expressed as the mean and SD of the number of revertants/plate in bacterial strains TA98, TA100, TA97a and TA102 exposed to MeOH extract and fractions A, B and C of *I. suffruticosa*, at various doses, with (+S9) or without (−S9) metabolic activation

Treatments mg/plate	Revertants/plate in <i>S. typhimurium</i> strains							
	TA98		TA97a		TA100		TA102	
	−S9 ^a	+S9 ^b	−S9 ^a	+S9 ^b	−S9 ^c	+S9 ^b	−S9 ^d	+S9 ^b
MeOH extract								
0	43±2.7	36±2.0	131±1.5	139±2.5	163±4.2	145±9.5	242±9.2	223±11.9
1.25	38±4.6 (0.9)	41±1.2 (1.1)	145±3.1 (1.1)	138±2.1 (0.9)	152±4.0 (0.9)	141±2.1 (0.9)	262±2.5 (1.1)	219±4.9 (0.9)
2.50	43±4.5 (1.0)	40±2.7 (1.1)	145±2.1 (1.1)	142±4.2 (1.0)	151±2.1 (0.9)	147±6.7 (1.0)	244±7.6 (1.0)	225±8.5 (1.0)
3.75	62±2.5** (1.4)	44±3.1 (1.2)	147±4.0 (1.1)	145±2.1 (1.0)	161±2.7 (0.9)	146±7.5 (1.0)	249±6.7 (1.0)	242±5.0 (1.1)
5.00	66±1.5** (1.5)	44±3.1 (1.2)	153±5.0 (1.2)	142±6.4 (1.0)	165±3.1 (1.0)	152±6.2 (1.0)	250±6.1 (1.0)	234±7.9 (1.0)
7.50	76±5.9** (1.8)	45±3.5 (1.2)	159±7.8 (1.2)	151±5.1 (1.0)	156±1.5 (0.9)	149±6.0 (1.0)	253±3.5 (1.0)	237±9.6 (1.1)
Fraction A (glycerolipids)								
0	43±2.7	36±2.0	131±1.5	139±2.5	148±2.5	143±5.0	239±16.7	210±11.1
0.12	46±1.7 (1.1)	35±2.0 (0.9)	131±2.1 (1.0)	136±3.5 (0.9)	159±4.2 (1.1)	145±3.0 (1.0)	251±7.0 (1.1)	227±7.6 (1.1)
0.38	47±1.5 (1.1)	38±2.5 (1.1)	134±3.1 (1.0)	135±3.1 (0.9)	160±2.0 (1.1)	147±3.1 (1.0)	260±6.0 (1.1)	235±5.0 (1.1)
0.75	50±1.5 (1.2)	42±1.5 (1.2)	139±5.0 (1.1)	138±1.2 (0.9)	163±3.1 (1.1)	152±2.1 (1.1)	264±8.4 (1.1)	247±5.0 (1.2)
1.50	55±3.6 (1.1)	45±1.6 (1.3)	143±2.5 (1.1)	142±2.1 (1.0)	170±1.5 (1.1)	160±2.0 (1.1)	265±5.0 (1.1)	255±5.0 (1.2)
Fraction B (flavonoids)								
0	43±2.7	36±2.0	131±1.5	139±2.5	148±2.5	143±5.0	239±16.7	210±11.1
0.12	45±1.5 (1.0)	42±2.0 (1.2)	142±1.5 (1.0)	136±2.0 (1.0)	149±4.2 (1.0)	136±3.1 (0.9)	244±3.2 (1.0)	219±8.1 (1.0)
0.38	52±1.5* (1.2)	43±4.5 (1.2)	142±1.0 (1.0)	139±1.5 (1.0)	152±3.6 (1.0)	140±2.5 (0.9)	249±2.1 (1.0)	239±6.1 (1.1)
0.75	63±3.1** (1.5)	48±1.2** (1.3)	144±3.1 (1.1)	141±2.1 (1.0)	153±5.5 (1.0)	142±2.1 (0.9)	248±26.2 (1.0)	243±5.0 (1.2)
1.50	81±1.5** (1.9)	54±2.5** (1.5)	149±1.5 (1.1)	144±3.2 (1.0)	158±2.0 (1.1)	143±2.0 (1.0)	272±6.2 (1.1)	264±4.7 (1.3)
Fraction C (alkaloids)								
0	43±2.7	36±2.0	131±1.5	139±2.5	148±2.5	143±5.0	239±16.7	210±11.1
0.12	46±1.5 (1.1)	31±1.7 (0.9)	142±2.0 (1.0)	139±1.2 (1.0)	151±2.3 (1.0)	140±2.7 (0.9)	255±4.2 (1.1)	228±5.7 (1.1)
0.38	50±2.0 (1.2)	38±1.5 (1.1)	146±1.2 (1.1)	139±3.1 (1.0)	153±2.5 (1.0)	145±3.0 (1.0)	269±1.2 (1.1)	239±4.2 (1.1)
0.75	69±1.2* (1.6)	40±1.5 (1.1)	152±2.0 (1.0)	143±3.1 (1.0)	165±3.8 (1.1)	149±2.1 (1.0)	278±5.3 (1.2)	243±5.9 (1.2)
1.50	85±1.5** (1.9)	47±1.2 (1.3)	152±4.4 (1.2)	143±1.5 (1.1)	180±2.0 (1.2)	154±2.5 (1.1)	306±7.2 (1.3)	255±4.7 (1.2)
Control +	466±34.1	607±30.3	703±24.7	750±55.7	955±33.0	797±32.1	1158±65.8	1158±49.4

MeOH: methanolic extract; 0 = negative control (DMSO—100 µl/plate); Control +: positive control.

^a4-Nitro-*o*-phenylenediamine (5.0 µg/plate); ^b2-anthramine (1.25 µg/plate); ^cSodium azide (1.25 µg/plate); ^dMitomycin C (0.5 µg/plate).

P* < 0.05, *P* < 0.01 (ANOVA). The values in brackets are MI values.

Table 3. Mutagenic activity expressed as the mean and SD of the number of revertants/plate in bacterial strain TA98 exposed to the compounds isolated from methanolic extract of *I. truxillensis* and *I. suffruticosa* at various doses, with (+S9) or without (−S9) metabolic activation

Treatment (mg/plate)	TA98 (−S9)	TA98 (+S9)
Positive control	867±1.4	991±10.1
Negative control	30±1.5	36±4.0
Alkaloids		
<i>Indigo</i>		
0.125	38±0.6 (1.3)	44±2.7* (1.2)
0.25	42±3.2 (1.4)	86±5.3** (2.4)
0.50	45±1.5 (1.5)	192±2.5** (5.3)
0.75	50±4.0* (1.7)	229±3.6** (6.7)
1.00	57±4.2** (1.9)	276±5.3** (7.7)
<i>Indirubin</i>		
0.125	46±2.7 (1.5)	36±2.0 (1.0)
0.25	58±3.8** (1.9)	36±4.0 (1.0)
0.50	58±3.0** (1.9)	38±2.5 (1.1)
0.75	63±1.7** (2.1)	43±4.0 (1.2)
1.00	63±3.6** (2.1)	46±3.6 (1.3)

Negative control: DMSO (100 µl/plate); Positive control: −S9: 4-nitro-*o*-phenylenediamine (10.0 µg/plate); +S9: 2-anthramine (1.25 µg/plate).

P* < 0.05, *P* < 0.01 (ANOVA). The values in brackets are MI values.

for the treatment of virus infections (50), inflammatory breathing diseases (51) and leukemia (52–54). The bis indole indirubin is an active ingredient of *Danggui Longhui Wan*, a traditional Chinese medicine used in

the treatment of chronic diseases such as leukemia. The antitumoral properties of indirubin appear to correlate with their antimetabolic effect. Indirubins were recently described as potent inhibitors of cyclin-dependent kinases (55).

Finally, it may be concluded that mutagenic activity observed in the methanol extract can probably be attributed to interaction between several compounds present in these species and the alkaloid indigo is the main compound responsible for this effect. The positive results in the Ames test for the MeOH extract suggest that the indiscriminate use of homemade preparations of this plant can be dangerous to health. Like synthetic medicines, natural products also need to be evaluated with regard to their pharmacological properties, toxicity, dosage, duration of treatment and safety.

Acknowledgements

The authors are thankful to Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), for funding and the fellowship to T.R.C., and the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), for grants to E.A.V. and W.V.

References

- Hasan A, Farman M, Ahmad I. Flavonoid glycosides from *Indigofera hebeptala*. *Phytochemistry* 1994;35:275–6.
- Hasan A, Ahmad I, Khan MA, Chudhary MI. Two flavonol triglycosides from flowers of *Indigofera hebeptala*. *Phytochemistry* 1996;43:1115–18.
- Chanayath N, Lhieochaiphant S, Phutrakul S. Pigment extraction techniques from the leaves of *Indigofera tinctoria* Linn and *Baphicacanthus cusia* Brem and chemical structure analysis of their major components. *CMU J* 2002;1:149–60.
- Garcez WS, Garcez FR, Barison A. Additional 3-nitropropanoyl esters of glucose from *Indigofera suffruticosa* (Leguminosae). *Biochem Syst Ecol* 2003;31:207–9.
- Miranda MC, Barbastefano V, Hiruma-Lima CA, Calvo TR, Vilegas W, Brito ARMS. Antitumor activity of *Indigofera truxillensis* Kunth. *Biota Neotropica* 2006;6:1–9.
- Farias-Silva E, Cola M, Calvo TR, Barbastefano V, Ferreira AL, Michelatto DP, et al. Antioxidant activity of indigo and its preventive effect against ethanol-induced DNA damage in rat gastric mucosa. *Planta Med* 2007;73:1241–6.
- Hastings RB. Medicinal legumes of Mexico: Fabaceae, Papilionoideae, Part One. *Econ Botany* 1990;44:336–48.
- Vieira JRC, Souza IA, Nascimento SC, Leite SP. *Indigofera suffruticosa*: an alternative anticancer therapy. *eCAM* 2007;4:355–9.
- Leite SP, Vieira JRC, Medeiros PL, Leite RMP, Lima VLM, Xavier HS, Lima E. Antimicrobial activity of *Indigofera suffruticosa*. *eCAM* 2006;3:261–5.
- Taylor JLS, Elgorashi EE, Maes E, Gorp UV, Kimpe ND, Staden JV, et al. Investigating the safety of plants used in South African traditional medicine: testing for genotoxicity in micronucleus and alkaline comet assays. *Environ Mol Mutagen* 2003;42:144–54.
- Maron DM, Ames BN. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat Res* 1983;113:173–215.
- Mortelmans K, Zeiger E. The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity test. *Mutat Res* 2000;455:29–60.
- Ames BN, Durston WE, Yamasaki E, Lee FD. Carcinogens are mutagens: a simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection. *Proc Natl Acad Sci USA* 1973;70:2281–5.
- Cooper CS, Grover PL. *Chemical Carcinogenesis and Mutagenesis I*. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 1990, 502.
- Guengerich FP, Shimada T. Oxidation of toxic and carcinogenic chemicals by human cytochrome P-450 enzymes. *Chem Res Toxicol* 1991;4:391–407.
- Guengerich FP. Metabolism of chemical carcinogens. *Carcinogenesis* 2000;21:345–51.
- Zeiger E. Identification of rodent carcinogens and non-carcinogens using genetic toxicity tests: premises, promises, and performance. *Regul Toxicol Pharmacol* 1998;28:85–95.
- Wagner HM, Bladt S, Zgainski EM. *Planta Drug Analysis*. Berlin: Springer, 1986, 355.
- Bernstein L, Kaldor J, McCann J, Pike MC. An empirical approach to the statistical analysis of mutagenesis data from the *Salmonella* test. *Mutat Res* 1982;97:267–81.
- Varella SD, Pozetti GL, Vilegas W, Varanda EA. Mutagenic activity of sweepings and pigments a household-was factory assayed with *Salmonella typhimurium*. *Food Chem Toxicol* 2004;42:2029–35.
- Santos FV, Colus IMS, Silva MA, Vilegas W, Varanda EA. Assessment of DNA damage induced by extracts and fractions of *Strychnos pseudoquina*, a Brazilian medicinal plant with antitumor activity. *Food Chem Toxicol* 2006;44:1585–9.
- Cardoso CRP, Cólus IMS, Bernardi CC, Sannomiya M, Vilegas W, Varanda EA. Mutagenic activity promoted by amentoflavone and methanolic extract of *Byrsonima crassa* Niedenzu. *Toxicology* 2006;225:55–63.
- Park S, Hahm KB, Oh TY, Jin JH, Choue R. Preventive effect of the flavonoid, wogonin, against ethanol-induced gastric mucosal damage in rats. *Dig Dis Sci* 2004;49:384–94.
- Toker G, Küpeli E, Memisoglu M, Yesilada E. Flavonoids with antinociceptive and anti-inflammatory activities from the leaves of *Tilia argentea* (silver linden). *J Ethnopharmacol* 2004;95:393–7.
- Suzuki S, Takada T, Sugawara Y, Muto T, Kominami R. Quercetin induces recombinational mutations in cultured cells as detected by DNA fingerprinting. *J Cancer Res* 1991;82:1061–4.
- Jurado J, Alexandre-Duran E, Alonso-Moraga A, Pueyo C. Study on the mutagenic activity of 13 bioflavonoids with the *Salmonella* Ara test. *Mutagenesis* 1991;6:289–95.
- Brown JB, Dietrich PS. Mutagenicity of plant flavonols in the *Salmonella*/mammalian microsome test. Activation of flavonol glycosides by mixed glycosidases from rat cecal bacteria and other sources. *Mutat Res* 1979;66:223–40.
- Gaspar J, Duarte Silva I, Laires A, Rodrigues A, Costa S, Rueff J. Natural antioxidants and food quality. In: Kumpulainen JT, Salonen JT (eds). *Atherosclerosis and Cancer Prevention*. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 1996, 290–7.
- MacGregor JT, Jurd L. Mutagenicity of plant flavonoids: structural requirements for mutagenic activity in *Salmonella typhimurium*. *Mutat Res* 1978;54:297–309.
- Rueff J, Laires A, Borba H, Chaveca T, Gomes MI, Halpern M. Genetic toxicology of flavonoids: the role of metabolic conditions in the induction of reverse mutation, SOS functions and sister chromatid exchanges. *Mutagenesis* 1986;1:179–83.
- Hartman PE, Shankel DM. Antimutagens and anticarcinogens: a survey of putative interceptor molecules. *Env Mol Mut* 1990;15:145–82.
- Duarte Silva I, Rodrigues A, Gaspar J, Maia R, Laires A, Rueff J. Mutagenicity of kaempferol in V79 cells: the role of cytochromes P450. *Teratog Carcinog Mutagen* 1996;16:229–41.
- Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J Nutr Biochem* 2002;13:572–84.
- Ensley BD, Ratzkin BJ, Osslund TD, Simon MJ, Wackett LP, Gibson DT. Expression of naphthalene oxidation genes in *Escherichia coli* results in the biosynthesis of indigo. *Science* 1983;222:167–9.
- Nam S, Buettner R, Turkson J, Kim D, Cheng JQ, Muehlbeyer S, et al. Indirubin derivatives inhibit Stat3 signaling and induce apoptosis in human cancer cells. *Biochemistry* 2005;102:5998–6003.
- Maugard T, Enaud E, Choisy P, Legoy MD. Identification of an indigo precursor from leaves of *Isatis tinctoria* (Woad). *Phytochemistry* 2001;58:897–904.
- Hosoe T, Nozawa K, Kawahara N, Fukusima K, Nishimura K, Miyaji M, et al. Isolation of a new potent cytotoxic pigment along with indigotin from the pathogenic basidiomycetous fungus *Schizophyllum commune*. *Mycopathologia* 1999;146:9–12.
- Gillam EMJ, Notley LM, Cai H, De Voss JJ, Guengerich FP. Oxidation of indole by cytochrome P450 enzymes. *Biochemistry* 2000;39:13817–24.
- Mori H, Sugie S, Yoshimi N, Asada Y, Furuya T, Williams GM. Genotoxicity of a variety of pyrrolizidine alkaloids in the hepatocyte primary culture-DNA repair test using rat, mouse, and hamster hepatocytes. *Cancer Res* 1985;45:3125–29.
- Wang C, Peng C. The mutagenicities of alkaloids and N-nitrosoguvacoline from betel quid. *Mutat Res* 1996;360:165–71.
- Mei N, Heflich RH, Chou MW, Chen T. Mutations Induced by the Carcinogenic Pyrrolizidine Alkaloid Riddelliine in the Liver *cH* Gene of Transgenic Big Blue Rats. *Chem Res Toxicol* 2004;17:814–18.
- Ansah C, Khan A, Gooderham NJ. In vitro genotoxicity of the West African anti-malarial herbal *Cryptolepis sanguinolenta* and its major alkaloid cryptolepine. *Toxicology* 2005;208:141–7.
- Cavalcanti BC, Sombra CML, Oliveira HHLJ, Berlink RGS, Moraes MO, Pessoa C. Cytotoxicity and genotoxicity of ingenamine G isolated from the Brazilian marine sponge *Pachychalina alcaloidifera*. *Comp Biochem Physiol* 2008;147(Pt C):409–15.
- Frederich M, Hayette MP, Tits M, De Mol P, Angenot L. In Vitro Activities of *Strychnos* Alkaloids and Extracts against *Plasmodium falciparum*, Antimicrob. *Agents Chemother* 1999;43:2328–31.
- Kingston DG, Gerhart BB, Ionescu F, Mangino MM, Sami SM. Plant anticancer agents V: new bisindole alkaloids from *Tabernaemontana johnstonii* stem bark. *J Pharm Sci* 1978;67:249–51.

46. Herbert A, Bottin MC, De Ceaurriz J, Protois JC, Cavalier C. Testing natural indigo for genotoxicity. *Toxicol Lett* 1984;21: 119–25.
47. Jongen WM, Alink GM. Enzyme-mediated mutagenicity in *Salmonella typhimurium* of contaminants of synthetic indigo products. *Food Chem Toxicol* 1982;20:917–20.
48. Panichayupakaranant P, Qian B, Sirikatitham A, Zhang RP, Guo YD, Wu YQ. Determinación cuantitativa de indigotina e indirubina en el indigo natural mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC). *Ars Pharm* 2005;46:429–38.
49. Bensky D, Clavey S, Stoger E, Gamble A. *Chinese Herbal Medicine, Materia Medica*, 3rd edn. Seattle: Eastland Press, 1986.
50. Mak N, Leung C, Wei X, Shen X, Wong RN, Leung K, et al. Inhibition of RNATES expression by indirubin in influenza virus-infected human bronchial epithelial cells. *Biochem Pharmacol* 2004;67:167–74.
51. Kunikata T, Tatefuji T, Aga H, Iwaki K, Ikeda M, Kurimoto M. Indirubin inhibits inflammatory reactions in delay-type hypersensitivity. *Eur J Pharmacol* 2000;410:93–100.
52. Wu LM, Yang YP, Zhu ZH. Studies on the activity principles of *Indigofera tinctoria* in the treatment of CML. *Comm Chinese Herbal Med* 1979;9:6–8.
53. Wu GY, Fang FD, Liu JZ, Chang A, Ho YH. Study on the mechanism of action of indirubin in the treatment of chronic granulocytic leukemia. I. Effect on nucleic acid and protein synthesis in human leukemic cells. *Chinese Med J* 1980;60:451–4.
54. Christina AJM, Josea MA, Roberta SJH, Kothaja R, Chidambaranathana N, Muthumanib P. Effect of *Indigofera aspalathoides* against Dalton's ascitic lymphoma. *Fitoterapia* 2003;74: 280–3.
55. Leclerc S, Garnier M, Hoessel R, Marko D, Bibb JA, Snyder GL, et al. Indirubins inhibit glycogen synthase kinase-3 beta and CDK5/p25, two protein kinases involved in abnormal tau phosphorylation in Alzheimer's disease. A property common to most cyclin-dependent kinase inhibitors? *J Biol Chem* 2001;276: 251–60.

Received February 18, 2009; accepted July 30, 2009



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Ethnopharmacology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jethpharm

Byrsonima fagifolia: An integrative study to validate the gastroprotective, healing, antidiarrheal, antimicrobial and mutagenic action

Zeila Pinheiro Lima^a, Raquel de Cássia dos Santos^a, Talita Uliana Torres^a, Miriam Sannomiya^b, Clenilson Martins Rodrigues^b, Lourdes Campaner dos Santos^b, Cláudia Helena Pellizzon^c, Lúcia Regina Machado Rocha^a, Wagner Vilegas^b, Alba Regina Monteiro Souza Brito^d, Cássia Regina Primila Cardoso^e, Eliana Aparecida Varanda^e, Helen Pimenta de Moraes^e, Taís Maria Bauab^e, Camila Carli^f, Iracilda Zeppone Carlos^f, Clélia Akiko Hiruma-Lima^{a,*}

^a São Paulo State University, Departamento de Fisiologia, Instituto de Biociências, cp 610, CEP 18618-000, UNESP, Botucatu, SP, Brazil

^b São Paulo State University, Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química, cp 355, CEP 14801-970, UNESP, Araraquara, SP, Brazil

^c São Paulo State University, Departamento de Morfologia, Instituto de Biociências, cp 610, CEP 18618-000, UNESP, Botucatu, SP, Brazil

^d Campinas State University, Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Biologia, cp 6109, CEP 13083-970, UNICAMP, Campinas, SP, Brazil

^e São Paulo State University, Departamento de Ciências Biológicas, cp 970, CEP 14801-970, UNESP, Araraquara, SP, Brazil

^f São Paulo State University, Departamento de Análises Clínicas, cp 502, CEP 14801-902, UNESP, Araraquara, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 6 May 2008

Received in revised form 25 July 2008

Accepted 31 July 2008

Available online 8 August 2008

Keywords:

Byrsonima fagifolia

Malpighiaceae

Healing effect

Antidiarrheal action

Mutagenicity

ABSTRACT

Ethnopharmacological relevance: Ethnopharmacological survey indicated leaves of *Byrsonima fagifolia* Nied. (Malpighiaceae) against gastrointestinal disorders.

Aim of the study: The methanolic extract from the leaves of *Byrsonima fagifolia* (denominated BF) was evaluated for toxic, mutagenic, gastroprotective, antidiarrheal, antibacterial and immunomodulatory activities. **Materials and methods:** The preventive and healing action of BF against gastric ulcer was evaluated in experimental models in rodents. We evaluated immunomodulatory (by murine peritoneal macrophages), antidiarrheal (by induced diarrhea with castor oil and intestinal motility) and antibacterial action of BF against standard strain of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Helicobacter pylori*. The safety of use of BF was also evaluated by mutagenic (Ames assay) and by analyses of toxicity parameters.

Results: Phytochemical BF profile indicated the presence of phenolic compounds with antioxidant and radical-scavenging properties. BF significantly inhibited gastric lesions induced by ethanol and HCl/ethanol and endogenous mucosal sulphhydryl groups (SHs) participated efficaciously in BF gastroprotection. BF blocked development of inflammation process and also has antidiarrheal actions. This extract accelerated the healing of the gastric ulcerated mucosa by stimulating proliferative factors and by increasing production of gastric mucus with no toxic action. The substances responsible for the protective action are concentrated in the ethyl acetate fraction that demonstrated no mutagenic action *in vitro*.

Conclusions: *Byrsonima fagifolia* presents gastroprotective, healing and antidiarrheal activities supporting previous claims that its traditional use by Brazilians can treat these gastrointestinal ailments.

Published by Elsevier Ireland Ltd

1. Introduction

It is estimated that peptic ulcer occurs in at least 10% of the population (Grob, 2004). In the hospital setting, there has been increased consumption of antiulcer drugs to prevent the gastric impact of aggressive factors including stress and non-steroidal antiinflammatory drugs (Carvajal et al., 2004). Another gastrointestinal disease that particularly affects developing countries is diarrhea. Kosek et

al. (2003) estimated that 4.6 million people died due to diarrhea per year mainly in developing countries. Against numerous gastrointestinal diseases the populations of developing countries have only medicinal plants as primary sources of medicine.

In Brazil, a large part of the population does not have access to modern medicine and is using medicinal plants as an alternative to these expensive remedies. Among these, some species belonging to the genus *Byrsonima* (Malpighiaceae) are intensely consumed as food in the form of juices, liquors, jellies and candies, as well as used against gastric pain, cutaneous diseases, snakebites and diarrhea (Amarquaye et al., 1994). *Byrsonima fagifolia* Nied. (Malpighiaceae) is an important Brazilian herb known as murici or murici-do-mato

* Corresponding author. Tel.: +55 1438116077; fax: +55 1438153744.
E-mail address: hiruma@ibb.unesp.br (C.A. Hiruma-Lima).

whose fruits are used as food. The leaves and bark infusions are used in folk medicine as anti-emetics and diuretics, and as treatments for ulcers, gastritis and diarrhea (Silva et al., 2000; Sannomiya et al., 2007). Despite the popular use of this specie as food and folk medicine, there are no pharmacological studies addressing its effect on the gastrointestinal tract. Despite the many beneficial actions of medicinal plants, recent investigations have revealed that many of these plants also have mutagenic effects (Santos et al., 2006). For example, another specie from the genus *Byrsonima*, *Byrsonima crassa* and *Byrsonima intermedia* presented mutagenicity or signs of mutagenic activity *in vitro*, but this action was not shown by the *in vivo* assay (Sannomiya et al., 2005, 2007).

Therefore, the aim of the present study was to evaluate the antiulcerogenic, healing and anti-diarrheal action of methanolic extract from *Byrsonima fagifolia*. We also observed the toxic and mutagenic action of this extract.

2. Materials and methods

2.1. Drugs and chemicals

The chemicals used were all of analytical grade: absolute ethanol, hydrochloric acid, acetic acid (Sinth, Brazil), lansoprazole and piroxicam (Hexal, Brazil), *N*-nitro-*L*-arginine methyl ester (*L*-NAME), carbenoxolone, cimetidine, *N*-ethylmaleimide (NEM) dimethylsulfoxide (DMSO), methanol, dichloromethane, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate sodium salt, *D*-glucose-6-phosphate disodium salt, magnesium chloride, *L*-histidine monohydrate, *D*-biotin, sodium azide, 2-anthramine, mitomycin, 4 nitro-*o*-phenylenediamine, tissue culture medium RPMI-1640, fetal bovine serum, sulfanilamide, naphthylethylenediamine dihydrochloride, phosphoric acid (H_3PO_4), sodium thioglycollate and lipopolysaccharide (LPS) (*Escherichia coli* 0111 B), all of which 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, magnesium sulfate, citric acid monohydrate, potassium phosphate dibasic anhydrous, sodium ammonium phosphate, sodium phosphate monobasic, sodium phosphate dibasic and sodium chloride were purchased from Merck (Whitehouse Station, NJ). All drugs and reagents were prepared immediately before use.

2.2. Plant material

Leaves of *Byrsonima fagifolia* Nied. were collected in July 2005 from Porto Nacional city, Tocantins State, Brazil and identified by Prof. E.R. Santos, from the Institute of Biology at Tocantins University. A herbarium specimen voucher (No. 6398) was deposited at the Herbarium of Tocantins University. The leaves were air-dried and powdered in a mill.

2.3. Extraction

The powdered leaves (2.0 kg) of *Byrsonima fagifolia* were extracted exhaustively with methanol at room temperature (48 h, three times). The extract (BF) was filtered and concentrated under reduced pressure at 60 °C to yield the MeOH (230.1 g, 11.5%).

2.4. Chromatographic analyses of BF

The chemical constituents present in BF were analyzed according to the method of Wagner et al. (1984). The chromatographic analyses were performed by TLC (Fluka silica gel plates on glass, 20 × 20 cm × 0.25 mm) eluted with *n*-butanol/acetic acid/water (BAW) 4:1:1, v/v/v. Approximately 10 µL of the BF was spotted

onto the TLC plate. Alkaloids are detected by spraying the plates with Dragendorff's reagent and iodoplatinate. Anthraquinones are detected using 10% potassium hydroxide solution in methanol. Flavonoids are detected by their intense fluorescence in visible or UV light when developed with a natural product/polyethylene glycol (NP/PEG) reagent. Generally, phenolic compounds are detected after exposing the plates to ammonia vapors and immediately observing the fluorescent spots under UV light. Saponins and triterpenes are detected with anisaldehyde-sulfuric acid reagent, which produces a range of colors after heating for 5 min at 100 °C. Tannins are detected with 5% ferric chloride solution in methanol and with 1% gelatin solution and iodine vapors. Standard solutions of (+)-catechin, rutin, isoquercitrin, quercetin, quercetin-3-*O*- β -*D*-glucopyranoside, kaempferol, yohimbine, gallic acid, tannic acid, lupeol and friedelin were prepared in methanol and used with reference compounds.

2.5. Fractionation of BF

An aliquot (3.5 g) of BF was fractionated on a Sephadex LH-20 (Pharmacia) column (100 cm × 4 cm), eluted with MeOH. Fractions (9 mL) were collected and checked by thin layer chromatography (TLC) on silica-gel plates eluted with $CHCl_3/MeOH/H_2O$ (80:18:2) and revealed either with NP/PEG (diphenylaminoborate/polyethyleneglycol) reagent or anisaldehyde/sulfuric acid solution (Wagner et al., 1984). Fractions 39–44 (140 mg) were purified by repeated CC on silica column (Merck) eluted with $CHCl_3/MeOH$ (80:20) yielding gallic acid (53 mg, 1.5%) and methyl gallate (25 mg, 0.8%), respectively. Fractions 91–95 (69 mg) and 96–108 (341 mg) were further purified by HPLC (Chance, Knauer) on a Phenomenex RP-18 column (250 mm × 10 mm i.d., 10 µm) monitored with a Knauer K200 ultraviolet detector, using $MeOH/H_2O$ (1:1) as eluent to produce quercetin-3-*O*- β -*D*-glucopyranoside (10 mg, 0.3%) and quercetin-3-*O*- β -*D*-xylopyranoside (13 mg, 0.4%), respectively. Fractions 113–129 (405 mg) were purified by HPLC using $MeOH/H_2O$ (6:4) to yield a mixture of quercetin-3-*O*-(2''-galloyl)- β -*D*-galactopyranoside and quercetin-3-*O*-(2''-galloyl)- β -*D*-glucopyranoside (45 mg, 1.3%). Comparison of the spectrometric data with those reported in the literature led to the identification of compounds above cited (Agrawal, 1989; Harborne, 1996; Binutu and Cordell, 2000). Another aliquot of BF was partitioned between water/ethyl acetate to provide 17.3 g (57.7%) of the water fraction and 8.1 g (27%) of the ethyl acetate fraction.

1D- and 2D NMR spectra (1H - 1H COSY, HMQC, TOCSY and HMBC) in $DMSO-d_6$ were obtained using a Varian INOVA 500 spectrometer operating at 500 MHz for 1H and 125 MHz for ^{13}C . Chemical shifts are given as δ (ppm) using TMS as an internal standard.

2.6. Antioxidant activity

The antioxidant activity of BF was evaluated by TLC under the conditions described above. Plates were revealed with 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) reagent as well as β -carotene solution (Potterat, 1997).

2.7. Animals

Male Swiss albino mice (25–35 g) and male Wistar albino rats (150–250 g) from the Central Animal House of the UNESP were used. The animals were fed a certified Nuvilab[®] (Nuvital) diet with free access to tap water under standard conditions of 12 h dark–12 h light, humidity (60 ± 1.0%) and temperature (21 ± 1 °C). Fasting was used prior to all assays because standard drugs and extract or fraction were always administered orally (by gavage route) using a saline solution (10 mL/kg) as the vehicle. Animals were kept in

cages with raised floors of wide mesh to prevent coprophagy. All experiments were performed in the morning, and followed the recommendations of the Canadian Council on Animal Care (Olfert et al., 1993). The UNESP Institutional Animal Care and Use Committee, approved all of the employed protocols.

2.8. Antiulcerogenic activity

2.8.1. Ethanol-induced ulcer

This experiment was performed as described by Morimoto et al. (1991). Rats were distributed into five groups, animals fasted 24 h prior to receiving an oral dose of the vehicle, saline (10 mL/kg), lansoprazole (30 mg/kg), BF (250, 500 or 1000 mg/kg body wt.) or fractions (50, 100 or 200 mg/kg body wt.). After 60 min, all groups were orally treated with 1 mL of absolute ethanol for gastric-ulcer induction. After another 1 h the animals were sacrificed, and the extent of the lesions was measured; the lesion index was expressed as the sum of all lesions as described by Szelenyi and Thieme (1978).

2.8.2. Hypothermic restraint-stress ulcer

The antiulcerogenic activity of BF in the hypothermic-restraint stress-induced gastric ulcer model was assessed in mice by the method of Levine (1971) with modifications. Mice were distributed into five groups of 5–7 animals. After starvation, the mice received a single oral administration of BF (250, 500 or 1000 mg/kg body wt.), cimetidine (100 mg/kg) or saline. One hour after treatment, gastric ulceration was induced by immobilizing the animals in a closed cylindrical cage maintained at 4 °C. After 4 h the mice were killed and the stomachs removed and examined for ulcers as described previously.

2.8.3. HCl/ethanol-induced ulcer

The experiments were performed as described by Mizui and Doteuchi (1983) with modification. Mice were distributed into groups of 5–8 animals that had fasted 24 h prior to receiving an oral dose of the vehicle, saline (10 mL/kg), lansoprazole (30 mg/kg), or BF (250, 500 or 1000 mg/kg body wt.). After 50 min, all groups were orally treated with 0.2 mL of a 0.3 M HCl/60% ethanol solution (HCl/ethanol) for gastric-ulcer induction. Animals were killed 1 h after the administration of HCl/ethanol and the gastric damage was determined as described above.

2.8.4. NSAID gastric ulcers in mice

In this model (Puscas et al., 1997) gastric lesions were induced with piroxicam (30 mg/kg, s.c.) administered to mice after a 24 h fast. BF (250, 500 or 1000 mg/kg body wt.), cimetidine (100 mg/kg) or saline was orally administered 30 min before the induction of the gastric lesions. Animals were killed 4 h after treatment with the ulcerogenic agent. The stomachs were removed and gastric lesion determined as described above.

2.8.5. Ethanol-induced gastric lesions in L-NAME-pretreated rats

Rats were distributed into groups that had fasted 24 h. Animals were treated with L-NAME (*N*-nitro-L-arginine methyl ester-70 mg/kg) or saline by i.p. route, and 30 min later received an oral dose of the vehicle (10 mL/kg), BF (500 mg/kg body wt.) or carbenoxolone (100 mg/kg). After another 60 min, all groups were orally treated with 1 mL of absolute ethanol to induce gastric ulcer (Arrieta et al., 2003). Animals were sacrificed 1 h after ethanol administration, and the stomachs excised and the gastric lesion determined as described previously.

2.8.6. Ethanol-induced gastric lesions in NEM-pretreated rats

Rats were distributed into groups that had fasted 24 h. They were initially treated intraperitoneally with NEM (*N*-ethylmaleimide-10 mg/kg) or saline, and 30 min later received an oral dose of the vehicle (10 mL/kg), BF (500 mg/kg body wt.) or carbenoxolone (100 mg/kg). After another 60 min, all groups were orally treated with 1 mL of absolute ethanol for gastric-ulcer induction (Arrieta et al., 2003). Animals were killed 1 h after ethanol administration, and the stomachs excised and the gastric lesion determined as described above.

2.8.7. Healing in acetic acid-induced gastric lesion

The experiments were performed according to the method described by Takagi et al. (1969), with some modifications. Three groups of male Wistar rats that had fasted for 24 h were used in this experiment ($n = 6-7$). Under anesthesia, a laparotomy was performed on all animals through a midline epigastric incision. After exposing the stomach, 0.05 mL (v/v) of a 30% acetic acid solution was injected into the subserosal layer in the glandular part of the anterior wall. The stomach was bathed with saline (20 °C) to avoid adherence to the external surface of the ulcerated region. The abdomen was then closed and all the animals were fed normally. We selected the dose of BF (500 mg/kg body wt.), cimetidine (100 mg/kg) or vehicle (10 mL/kg) to determine healing effects by the subacute treatment. All treatments were administered orally once a day for 14 consecutive days beginning 1 day after surgery. Body weight was recorded daily throughout the experiments and the macroscopic analyses and weight of vital organs (liver, kidney, heart, spleen and lung) were compared among the different treatments to evaluate the possible subacute toxicity induced by the treatments. On the day after the last drug administration, the rats were killed and their stomachs removed. The gastric lesions were evaluated by examining the inner gastric surface with a dissecting magnifying glass. The macroscopic ulcer area (mm²) and curative ratio (%) were subsequently determined as described by Takagi et al. (1969).

2.8.8. Histological methods

The stomach of the rats submitted to gastric ulcers in the acetic acid model with different treatments was removed and opened by the large curves; and the lesion was located, sectioned, and fixed in ALPAC solution (alcohol, chloroform and acetic acid) for 24 h at 4 °C. Then the samples were routinely processed for embedding in paraplast, and cut into 7- μ m-thick sections that were stained with periodic acid-Schiff (PAS) (Vacca, 1985) and hematoxylin-eosin (Behmer et al., 1976). The samples were analyzed with a Leica microscope in association with Leica Qwin Software (Leica-England).

2.8.9. Biochemical analysis

The blood of rats submitted to the different treatments was collected immediately after the sacrifice and submitted to centrifugation (3000 \times g for 10 min). After the centrifugation, the serum obtained was frozen at -20 °C until the biochemical analyses. Serum biochemical parameters including urea, creatinine, aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) were measured by automated biochemical analyzer (SBA-200, CELM, Brazil).

2.8.10. Morphometric analyses

For the morphometric analyses a slice of stomach was examined in a Leica microscope coupled with Leica Qwin Software (Leica-England), where the area of regeneration mucosa was measured

by employing a variation of the method used by Ishihara and Ito (2002).

2.8.11. Immunohistochemistry

Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) was utilized to determine proliferating cells, for which representative slices were deparaffinized, dehydrated and immunostained by the peroxidase anti-peroxidase method. High temperature antigen unmasking technique in 0.01 M citrate buffer pH 6 in a microwave oven was performed two times for 5 min total. Blocking of nonspecific reaction was completed with 1% normal goat serum and 3% not-fat milk, and PCNA mouse monoclonal antibody (Novo Castra NCL-PCNA) (1:100). After rising in phosphate buffered saline (0.01 mol/L PBS pH 7.4), the sections were incubated in secondary antiserum. They were then washed in PBS and incubated in ABC (avidine and biotiny complex) reagents (ABC kit-Vector) and incubated in peroxidase reaction (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride containing 0.01% H₂O₂ in PBS buffer). After being immunostained, the sections were lightly counterstained with Mayer's hematoxylin. The slides were observed under a Leica light microscope. For positive control we used the stem cell region in stomach mucosa and for negative control the primary and secondary antibodies were omitted.

2.9. Castor oil-induced diarrhea

Groups of male Wistar rats were orally treated with vehicle (10 mL/kg), BF (500 mg/kg body wt.) or loperamide (3 mg/kg) 30 min before castor oil (1 mL/rats, p.o.) administration. Immediately after ingesting castor oil, each animal was kept in an individual cage whose floor was lined with blotting paper and observed for 5 h. The following parameters were then observed: onset of diarrhea, number of wet feces, total frequency of fecal outputs, total weight of wet feces and total weight of fecal output. A numerical score based on stool consistency was assigned—1 (normal stool), 2 (semi-solid stool), and 3 (watery stool). Each group received an evacuation index (EI) expressed according to the formula: $EI = 1 \times (\text{no. stool } 1) + 2 \times (\text{no. stool } 2) + 3 \times (\text{no. stool } 3)$ (Crocci et al., 1994).

2.10. Gastrointestinal motility (charcoal meal) in mice

Male Albino Swiss mice were weighed and deprived of food, but had free access to water. Three hours after food deprivation, the animals received orally by gavage saline as negative control, 3 mg/kg of loperamide as positive control, or methanolic extract of BF 500 mg/kg (time zero). After 90 min, charcoal 10% was administered to each animal orally by gavage (time 90 min). Sixty minutes later they had free access to food (time 150 min). The animals were observed at 5-min intervals until feces with charcoal were eliminated (maximum time of observation was 300 min after charcoal administration). Charcoal was observed on the feces using normal light when it was easily visible, or using a microscope to aid in identification of the black spots. The results were based on the time elapsed for the charcoal to be eliminated (Marona and Lucchesi, 2004).

2.11. Inhibition of NO production by peritoneal exudate cells (PEC)

Thioglycolate-elicited PEC was harvested from Swiss mice by using 5.0 mL of sterile PBS, pH 7.4. The cells were washed twice by centrifugation at $200 \times g$ for 5 min at 4 °C and resuspended in RPMI-1640 complete medium. The cells were resuspended in RPMI-1640 complete medium and adjusted to 5×10^6 cells/mL. 100 μ L of the suspension was placed in each well of a 96-well microplate and mixed with 100 μ L of the extract + 100 μ L of LPS and then, the

plates were incubated 24 h at 37 °C under 7.5% CO₂. Lipopolysaccharide (LPS-*Escherichia coli* O111:B) was used as positive control. The nitrite concentrations were indirectly measured by a quantitative colorimetric assay using the Griess reagent system: 50.0 μ L aliquots of supernatant were added to 50.0 μ L of Griess reagent (1% sulfanilamide, 0.1% naphthylethylenediamine and 3% H₃PO₄), incubated at room temperature for 10 min, and the absorbance was measured at 540 nm in an Elisa microplate reader (Multiskan Ascent Labsystems). Samples in triplicate were assayed and reported as μ mol NO/5 $\times 10^5$ cells \pm S.D., measured from the standard curve (Green et al., 1982).

2.12. Ames mutagenicity assay

The *Salmonella* mutagenicity assay was performed using the pre-incubation method for 20–30 min (Maron and Ames, 1983) with *Salmonella 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. *Salmonella typhimurium* strains were kindly provided by Dr. B. Ames, University of California, Berkeley, CA, USA. Five different doses of methanol extract as well as aqueous and acetate fractions were evaluated in this assay. All of them were diluted in dimethylsulfoxide. 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 at 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 onto 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 (10 μ g/plate) for TA98 and TA97a, sodium azide (1.25 μ g/plate) for TA100 and mitomycin (0.5 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 mutagenic index (MI) was also calculated for each dose as 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 (Santos et al., 2006).

2.13. Antibacterial activity

2.13.1. Bacterial strains and culture conditions

The microorganisms used were: *Escherichia coli* (ATCC25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) and *Helicobacter pylori* (ATCC43504). Stock cultures of the strains of the *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* were maintained at –80 °C on Brain Heart Infusion broth (BHIB) containing 20% glycerol. Cultures were prepared from stock cultures for replication in Muller-Hinton agar. After an overnight incubation at 37 °C the cells were suspended in sterile saline to obtain turbidity equivalent to a 0.5 McFarland standard ($\sim 10^8$ CFU/mL) (Salvat et al., 2004). Stock culture of *Helicobacter pylori* was stored at –80 °C on Muller-Hinton Broth (MHB) containing 5% bovine calf serum and 20% glycerol. Stocks were

subcultured on Muller-Hinton agar added 10% sheep blood and incubated at 37 °C for 72 h in a microaerobic atmosphere (80% N₂, 15% CO₂, and 5% O₂) at 98% humidity. The cells were suspended in sterile saline to obtain turbidity equivalent to a 0.5 McFarland standard.

2.13.2. Evaluation of the antibacterial activity by disc diffusion technique

Muller-Hinton agar was used for susceptibility testing. Disks 6 mm in diameter were punched from a sheet of Whatman filter paper, sterilized and impregnated with 25 µL of each extract or sorbent alone and dried at 30–35 °C for 12–14 h. The bacterial inoculum was prepared and adjusted to ~10⁸ CFU/mL (corresponding to 0.5 McFarland standards) and a sterile cotton swab was dipped into the standardized bacterial suspension and used to inoculate the Muller-Hinton agar plates. The plates were allowed to dry for 3–5 min.

Thereafter, all disks were placed on the plates and maintained at distance of at least 15 mm from the plate edges to prevent overlapping of inhibition zones. A clarithromycin disk (15 µg/mL), metronidazole disk (50 µg/mL), ampicillin disk (10 µg/mL) and 80% DMSO-impregnated disks were used as controls. Fifteen minutes following placement of the disks, the plates of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* were incubated at 37 °C for 18–24 h although the plates of *Helicobacter pylori* were incubated at 37 °C for 2–5 days in a microaerobic atmosphere and 98% humidity. They were then examined and the diameter of the inhibition zone measured.

2.13.3. Evaluation of the antibacterial activity by broth microdilution procedure

The minimum inhibitory concentration (MIC) was determined by using dilution assay in 96-well microtiter plate. 100 µL of Muller-Hinton broth for *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* and the same medium containing 10% horse serum for *Helicobacter pylori* were added to all wells of a 96-well microtiter plate (Corning-USA). Each microplate was incubated with bacteria (100 µL) at a final concentration of ~10⁷ CFU/mL and 20 µL solution of each dilution of plant extracts at concentrations between 1000 µL and 6.25 µg/mL using twofold serial dilutions. The plates were incubated for 3 days in a microaerobic atmosphere at 37 °C and the plates of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* were incubated overnight at 37 °C. All plates were examined visually and spectrophotometrically and the lowest concentration showing complete growth inhibition was recorded as the minimum inhibitory concentration (MIC) for the extract or fractions. Ampicillin (10 µg/mL), metronidazole (50 µg/mL), clarithromycin (15 µg/mL) and 80% DMSO solutions were used as controls.

2.13.4. Determination of minimum bactericidal concentration (MBC) (Bergonzelli et al., 2003)

To determine the MBC, 50 µL of the contents of the MIC microplate was serially diluted 10-fold in 0.9% physiological saline. Each dilution was inoculated onto Muller-Hinton agar plates for *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* and Muller-Hinton agar containing 10% sheep blood for *Helicobacter pylori*. The MBC was recorded as the lowest concentration of the extract that completely inhibited colony formation of the test bacteria.

2.14. Statistical analysis

Results were expressed as mean ± S.E.M. Statistical significance was determined by one-way analysis of variance followed by Dunnett's or Tukey's test, with the level of significance at $p < 0.05$. The

statistical analysis was performed with the Salanal computer program, adopting the Bernstein et al. (1982) model.

3. Results and discussion

The methanolic extract from *Byrsonima fagifolia* leaves (BF) was first evaluated for its antioxidant activity, using TLC silica-gel plates sprayed with β-carotene and DPPH reagents. Analyses revealed a number of spots distributed throughout the plate, thus evidencing the presence of several substances with potential antioxidant properties. Pulverization with NP/PEG reagent led to orange spots, suggesting the presence of flavonoids (Wagner et al., 1984). Hence, BF was fractionated by gel permeation chromatography and fractions were further purified by HPLC to yield the following phenolic compounds: gallic acid, methyl gallate, quercetin-3-O-β-D-glycopyranoside, quercetin-3-O-β-D-xylopyranoside, quercetin-3-O-(2"-galloyl)-β-D-galactopyranoside and quercetin-3-O-(2"-galloyl)-β-D-glycopyranoside. Similar flavonoids and their glycosides, as well as gallic acid derivatives had already been reported in an investigation of *Byrsonima crassa* (Sannomiya et al., 2005). All the compounds isolated from *Byrsonima fagifolia* have a catecholic group in their structures, which may explain the antioxidant properties observed using the TLC test (Azuma et al., 2000).

In the next step, the BF effect from the doses of 250, 500 or 1000 mg/kg was tested in models of gastric ulcers induced by different damaging agents (Table 1). Using the ethanol model, pretreatment of rats with BF led to significant inhibition of gastric lesions: at doses of 500 and 1000 mg/kg. The inhibition exerted by BF was twice as high as that produced by the commercial drug lansoprazole (42%). In fact, at the highest dose (1000 mg/kg), BF induced complete gastroprotection (99%). In the case of ulcers induced by HCl-ethanol model, significant inhibitions were obtained using all BF doses: 250 (30%), 500 (47%) and 1000 mg/kg (81%). The ingestion of ethanol is known to evoke acute tissue edema, sub-epithelial hemorrhages, cellular exfoliation, and time-dependent infiltration by inflammatory cells that may contribute to the induction of mucosal injury through the generation of reactive oxygen species (Kwiicien et al., 2002). Ethanol is also able to induce direct oxidative damage against gastric mucosal tissues. It increases superoxide anion and hydroxyl radical production and lipid peroxidation in the gastric mucosa (Repetto and Llesuy, 2002). A variety of causes of gastric ulcers such as alcohol consumption, stress, *Helicobacter pylori* contamination and use of non-steroidal antiinflammatory drugs are known to be mediated through the production of reactive oxygen species (ROS) (Rastogi et al., 1998). Flavonoids and other natural substances, especially those containing catecholic groups in their structures, are known for their ability to scavenge radicals, thus preventing some deleterious processes in the human body (Repetto and Llesuy, 2002). Therefore, it is possible that antioxidant compounds present in BF and detected in DPPH reaction might play a relevant role in mediating gastroprotective action of this extract.

The pathogenesis of stress-related mucosal damage is not entirely clear, but it plays an integral role in and probably is associated with impairment of mucosal protective mechanisms due to compromise of gastric mucosal microcirculation and increase in gastric secretion. Proton-pump inhibitors and histamine H₂ receptor antagonists are commonly utilized to prevent stress-related mucosal bleeding (Maton, 2005). BF was evaluated in the gastric ulcer induced by hypothermic-restraint stress (Table 1) but this extract did not show significant inhibition of gastric lesion in mice mucosa ($p > 0.05$). This result indicates that BF did not exert antiulcer action by an antisecretory mechanism like cimetidine.

Table 1Effects of different doses of methanolic extract from *Byrsonima fagifolia* (BF) on models of gastric lesions induced in rodents

Method (animal)	Treatment (p.o.)	Dose (mg/kg)	n	Lesion index	Inhibition (%)
Ethanol (rats)	Control	–	5	203.4 ± 27.3	–
	Lansoprazole	30	5	117.4 ± 16.1*	42
	BF	250	4	73.2 ± 9.1	64
		500	5	56.2 ± 16.6*	72
		1000	5	1.8 ± 0.7*	99
Stress (mice)	Control	–	6	24.2 ± 6.2	–
	Cimetidine	100	7	8.7 ± 4.6**	64
	BF	250	5	21.8 ± 11.7	10
		500	4	14.5 ± 1.7	40
		1000	5	16.6 ± 4.1	31
HCl/ethanol (mice)	Control	–	5	73.4 ± 8.4	–
	Lansoprazole	30	5	37.6 ± 10.9**	49
	BF	250	5	51.2 ± 8.8*	30
		500	5	39.2 ± 6.9*	47
		1000	5	14.0 ± 2.8**	81
Piroxicam (mice)	Control	–	8	26.6 ± 4.0	–
	Cimetidine	100	8	7.9 ± 2.0**	70
	BF	250	5	21.8 ± 2.3	18
		500	5	14.8 ± 2.6	44
		1000	5	25.2 ± 6.3	05
Ethanol (rats)	Control	–	7	119.6 ± 8.2	–
	Carbenoxolone	100	6	17.5 ± 4.4**	85
	Aqueous Fr.	100	5	101.0 ± 6.2	15
	Acetate Fr.	50	6	62.2 ± 11.6*	48
		100	5	36.6 ± 7.3**	69
	200	5	25.4 ± 10.8**	79	

Results are mean ± S.E.M. ANOVA followed by Dunnett's test: U.L.1 * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. Ethanol model: $F_{(4;19)} = 24.2$; stress model: $F_{(4;22)} = 12.1$; HCl/ethanol model: $F_{(4;20)} = 5.3$; piroxicam model: $F_{(4;26)} = 5.3$; ethanol model with fraction: $F_{(5;28)} = 15.1$. Fr. – fraction.

Although stressful lifestyle contributes to gastric ulcer disease, there has been an increase in consumption of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) among both young people and the elderly (Ribeiro et al., 2006). Piroxicam is a preferential COX-1 inhibitor. It is known that the protective mechanism exhibited by mucus and bicarbonate secretion depends to a large extent on prostaglandin E_2 secretion, and this in turn depends on the activity of the cyclooxygenase (COX) enzyme system (Peskar and Maricic, 1998). We observed that pretreatment with BF does not show a significant gastroprotection at any of the doses tested (Table 1). Consequently, this result suggests that the BF gastroprotective mechanism also does not involve endogenous prostaglandins. Additionally, prostaglandins, another large variety of endogenous factors – including growth

factors, gastrin, somatostatin, nitric oxide (NO) and sulphhydryl (SH) groups – have been implicated in gastroprotection (Wallace and Granger, 1996). These factors maintained the gastric mucosa as well as the condition and integrity of local microcirculation. Among other factors, nitric oxide is a vasoactive agent that may play a central role in mucosal defensive processes and also in ulcer healing by stimulating the formation of growth factors, while the local release of mediators such as SH groups is implicated in the regulation of some gastric functions (Gyires, 2005). Therefore, as a part of the present work, we investigated the influence of NO and SH groups in association with BF (Table 2). The aforementioned results indicate that further experiments should be conducted using BF at the dose of 500 mg/kg. No significant differences between the doses of 500

Table 2Effects of methanolic extract of *Byrsonima fagifolia* (BF) on gastric lesions induced by ethanol in different combinations of L-NAME (an inhibitor of nitric oxide synthase) or NEM (a blocker of sulphhydryl groups) on pretreated rats ($n = 7$)

Pretreatment	Treatment (p.o.)	Doses (mg/kg)	Lesion index (mm)	Protection (%)	Statistical analysis (Fisher's test)	$p < 0.01$
Saline +	Saline	–	58.7 ± 20.7	–	Saline + saline vs. saline + L-NAME	$p < 0.01$
Saline +	Carbenoxolone	100	5.8 ± 3.4**	90		
Saline +	BF	500	0 ± 0**	100	Saline + carbenoxolone vs. L-NAME + carbenoxolone	$p < 0.01$
L-NAME +	Saline	70	135.8 ± 24.6	–		
L-NAME +	Carbenoxolone	70/100	69.8 ± 7.8*	49	Saline + BF vs. L-NAME + BF	$p < 0.05$
L-NAME +	BF	70/500	42.8 ± 18.0**	69		
Saline +	Saline	–	119.6 ± 21.3	–	Saline + saline vs. Saline + NEM	$p < 0.01$
Saline +	Carbenoxolone	100	26.8 ± 5.4**	78		
Saline +	BF	500	11.0 ± 1.5**	91	Saline + carbenoxolone vs. NEM + carbenoxolone	$p < 0.01$
NEM +	Saline	10	299.0 ± 13.1	–		
NEM +	Carbenoxolone	10/100	54.1 ± 14.0**	82	Saline + BF vs. NEM + BF	$p < 0.05$
NEM +	BF	10/500	199.0 ± 24.1	35		

Results are mean ± S.E.M. ANOVA was employed followed by Fisher's test. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ represents significant difference from the control group.

Table 3

Inhibition of NO production by peritoneal exudate cells in contact with methanolic extract from *Byrsonima fagifolia* (BF)

Treatment	NO concentration ($\mu\text{mol}/5 \times 10^5$ cells \pm S.D.)
BF + LPS	4.5 \pm 1.2***
Positive control (LPS)	67.6 \pm 3.3
Negative control (cells + culture medium)	4.4 \pm 1.3

Adherent cells (5×10^6 cells/mL) were incubated for 24 h with extract + LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Cell-free supernatant was mixed with Griess reagent. Cells incubated with only LPS were used as a positive control and cells in culture medium (RPMI-1640) as a negative control. *** $p < 0.001$ when compared to LPS.

and 1000 mg/kg were observed using BF ($p > 0.05$), so the following experiments were developed using lower BF doses.

NO is implicated in multiple important processes in gastro-hepatic biology whereas some diseases are associated with excess generation of NO (Shah, 2005). Through a variety of mechanisms, cells exposed to NO undergo DNA damage, which may result in a combination of cell deaths and mutagenesis (Tamir and Tannenbaum, 1996). In spite of the importance of the immunological system in gastroprotection, it is necessary to modulate the production of inflammatory mediators. As shown in Table 2, NO synthase inhibitor attenuates BF gastroprotection (100% vs. 69%). This result suggests that endogenous NO participate in the protective effect of BF. But when macrophages were exposed to BF and LPS concomitantly (Table 3), BF inhibited LPS-stimulated murine peritoneal macrophages ($p < 0.001$). Some flavonoids have recently been associated with antiinflammatory activity due to their capacity to act as scavengers of free radicals such as NO and H_2O_2 (Lopes et al., 2005). The nitric oxide molecule, which presents a short half-life, is produced by nitric oxide synthase (iNOS) in macrophages (Loibl et al., 2006). This mediator acts in a range of bioactivity including neurotransmission, vascular homeostasis, immune regulation, host defense and gastroprotection (Wallace and Granger, 1996). The immunological assay showed that BF acts powerfully to inhibit NO (approximately 93%) by LPS-stimulated macrophages. So, agents that modulate the activity of NO may be of considerable therapeutic value. In particular, those that reduce the formation of NO may be beneficial in pathophysiological conditions where excessive NO production is a contributory factor to conditions such as septic shock, neurodegenerative disorders and inflammation (Lopes et al., 2005).

There are experimental signs that an increased bioavailability of SH compounds may account for protection of the gastric mucosa against diverse injurious agents (Szabo et al., 1981). Endogenous SH radicals and other antioxidant compounds appear to be implicated in counteracting gastric lesions associated with *Helicobacter pylori* infection (Jung et al., 2001). Sulphydryl compounds have been significantly implicated in the maintenance of gastric integrity, particularly when reactive oxygen species are involved in the pathophysiology of tissue damage (Kimura et al., 2001). The possible involvement of endogenous SHs in the gastroprotective effect

was investigated after pretreatment of the animals with BF followed by NEM, an SH-blocker (Table 2). Animals pretreated with NEM and treated with BF (500 mg/kg) showed significant (91% vs. 35%) reduction in gastroprotection, indicating the strong participation of endogenous SHs in the gastroprotective effect of this extract.

The confirmation of gastroprotective action from BF does not imply that this medicinal plant also has healing effect on gastric mucosa. The ulcer produced by the injection of acetic acid into the rat stomach wall was assumed to be similar to human chronic ulcer, since it is difficult to treat and requires a long time to heal (Okabe and Amagase, 2005). Oral administration of BF for 14 consecutive days accelerated the healing of the gastric mucosa (when observed by macroscopic analysis of injuries), producing lesion cure rates of 45% (external area) and 42% (internal area) compared to the vehicle-treated control group (Table 4). These values are similar to those obtained using cimetidine (58 and 60%, respectively). The comparative morphometric measurements of the normal and regenerative distances showed transition region increases for the three groups (Table 4).

Our morphological analysis evidenced that regenerated areas of the gastric mucosa expanded the transition area as a result of the BF treatment (500 mg/kg), thus demonstrating that BF stimulated proliferative factors that led to healing. Organization of the glands was not observed in the stomach mucosa from animal treated with vehicle. However, glands presented analogous mucus secretion in the lumen between the BF-treated and cimetidine-treated groups (Fig. 1). The increased gastric mucus production using BF was also verified via an increase in PAS-positive mucus (Fig. 2), which is indicative of gastroprotection. A number of factors appear to influence ulcer healing, a process for which mucus and bicarbonate secretion may be important since the mucus/bicarbonate layer protects newly formed cells from acid and peptic injury (Tarnawski et al., 2001).

Gastrointestinal cell proliferation plays an important role in the maintaining gastrointestinal system integrity. Cell division in the gastrointestinal tract is confined to an anatomically discrete zone, the proliferative compartment. This readily identifiable anatomical position, together with its high proliferation rates, makes it an ideal system for the study of epithelial growth control and stem cell biology: stem cells in the gastrointestinal mucosa are pluripotent, having the ability to give rise to cells of more than one lineage (Okamoto and Watanabe, 2004). The use of immunohistochemical techniques enables the visualization of specific cell-cycle-related antigens in tissues, with the important advantage of preserving the spatial orientation of cells. PC10 is a monoclonal antibody that recognizes the proliferation cell nuclear antigen (PCNA), a protein associated with DNA polymerase and found in cycling cells (Wong and Wright, 1999). PCNA is a highly conserved 36 kDa nuclear polypeptide identified as the auxiliary protein of DNA polymerase delta (Nanji and Tahan, 1996). Morphological analysis of the slides submitted to PCNA (Fig. 3) show that cimetidine significantly inhibited cell proliferation in three out of the five cell lines, which may indicate the dependence of proliferation of these cell lines on stim-

Table 4

Effects of the treatment for 14 consecutive days with methanolic extract from *Byrsonima fagifolia*-BF (500 mg/kg) or cimetidine (100 mg/kg) on healing of ulcer produced by injecting acetic acid solution into the stomachs of rats

Treatments (p.o.)	Lesion area (mm^2)		Epithelial height (μm)			
	External	%	Internal	%	Normal	Area of regeneration
Saline	238.0 \pm 39.8	–	62.0 \pm 5.0	–	555.4 \pm 41.7	954.1 \pm 86.4
Cimetidine	99.9 \pm 24.4**	58	25.1 \pm 4.9**	60	628.1 \pm 37.5	900.8 \pm 236.0
BF	131.9 \pm 12.3*	45	36.1 \pm 6.7**	42	514.4 \pm 23.6	823.8 \pm 51.9

Macroscopic analysis of lesion area and epithelial height of gastric mucosa. Results are mean \pm S.E.M. ($n = 6-7$). Dunnett's test * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$. External lesion area $F_{(2;17)} = 6.4$; internal lesion area $F_{(2;17)} = 11.8$; normal area not significant $p > 0.05$, $F_{(2;17)} = 2.1$, regeneration area not significant $p > 0.05$, $F_{(2;17)} = 0.5$.

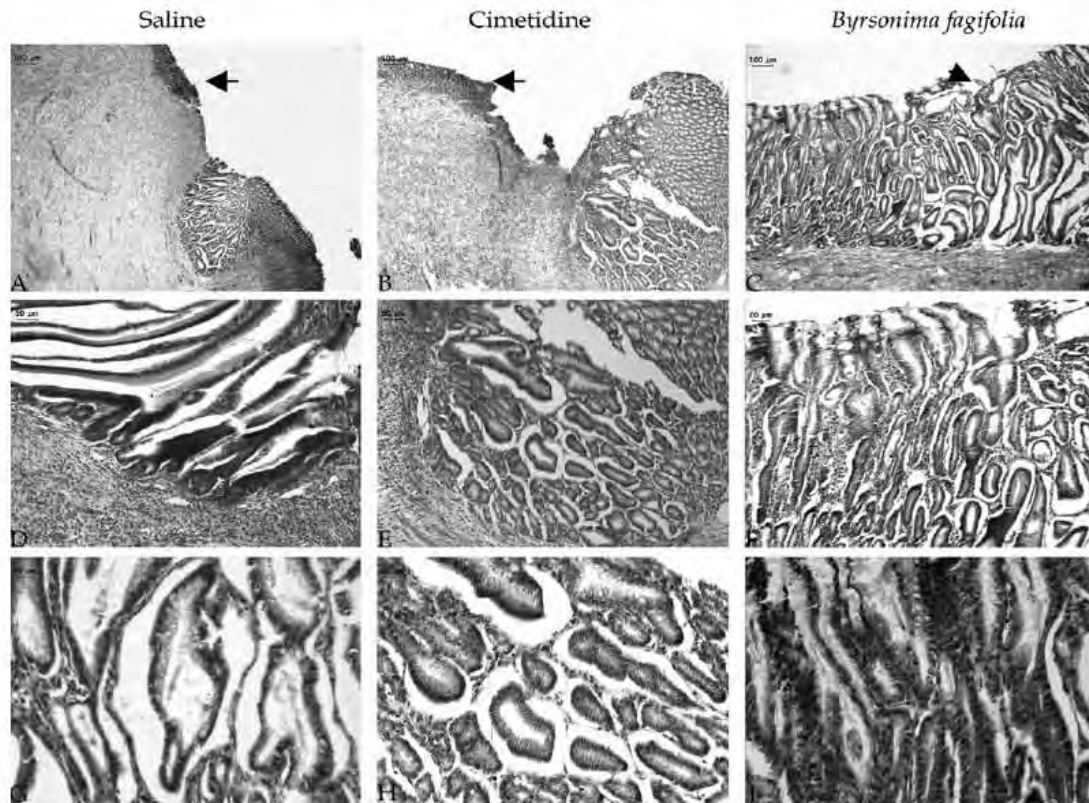


Fig. 1. Histological analyses of rat stomach treated with saline (10 mL/kg), cimetidine (100 mg/kg) or *Byrsonima fagifolia* (500 mg/kg) stained with hematoxylin and eosin. The arrows indicate the lesion areas, and in (A) and (B) show the scar and (C) the regeneration area. The # indicated lumen of gastric glandules, and * denotes mucus inside the lumen.

ulation of the H_2 receptor (Finn et al., 1996). In the BF group there are increases of cell proliferation in the base of mucosa glands in the lesion region (Fig. 3).

The healing activity could be due to the presence of compounds with antioxidant properties, since they are able to reduce the effect of reactive species that are injurious to the gastric mucosa. In fact, Galati et al. (2003) report that a fraction of *Opuntia ficus indica* containing the quercetin-derived flavonoids rutin (quercetin-3-rutinoside) and isorhamnetin (3-methylquercetin) presents the aforementioned activities. The same authors argue that absorption of flavonoid glycosides in the small intestine may be prevented due to their hydrophilic nature, but when they are cleaved from their respective aglycones, flavonoids can be absorbed and produce systemic effects. It is interesting to observe that, although *Byrsonima fagifolia* presents quercetin glycosides as its constituents do, esterification

of the sugar moiety with gallic acid reduces the hydrophilicity of compounds quercetin-3-O-(2''-galloyl)- β -D-galactopyranoside and quercetin-3-O-(2''-galloyl)- β -D-glycopyranoside, thus leading to the possibility of improved absorption. Our group has already observed an increase of gastric mucosal defensive factors, such as prostaglandin and mucus, after administration of the extract from the aerial parts of *Turnera ulmifolia* (Turneraceae) that contains mainly flavonoid glycosides (Antonio and Souza Brito, 1998).

We have not studied the isolated active principles involved in the antiulcer activity of BF, since they are produced in small amounts. However, an aliquot of BF was partitioned between water and ethyl acetate. Both fractions were tested in the ethanol model because this model represents the best results with extract (Table 1). The dose of 100 mg/kg from both fractions was used according to Schmeda-Hirschmann and Yesilada (2005) who



Fig. 2. Histological analyses of rat stomach treated with saline (10 mL/kg), cimetidine (100 mg/kg) or *Byrsonima fagifolia* (500 mg/kg), by PAS staining. Note the intense secretion of mucus of *Byrsonima fagifolia* (arrow) similar to cimetidine group secretion. Note the difference of luminal mucus (*).

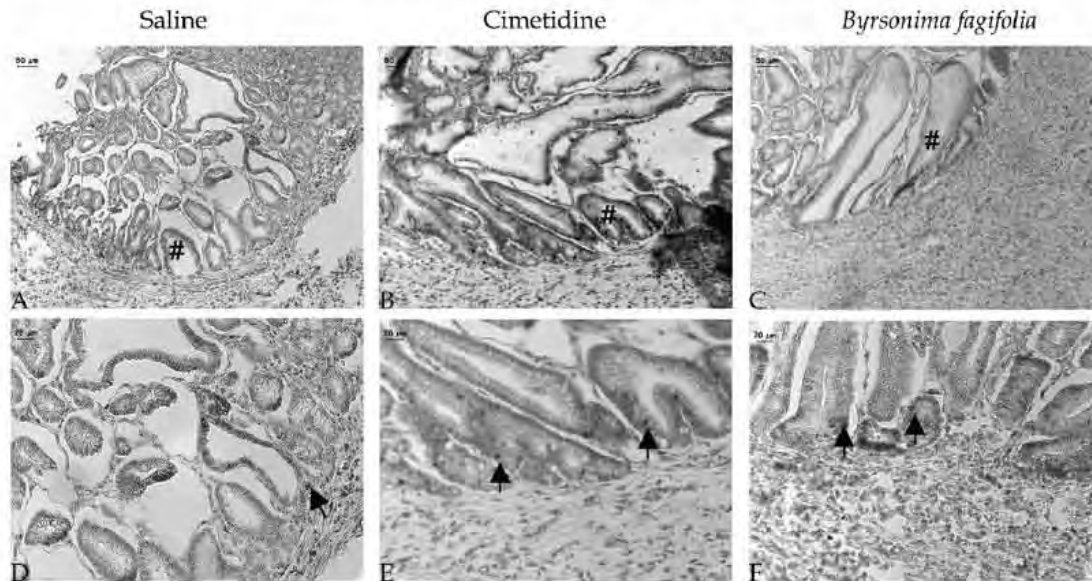
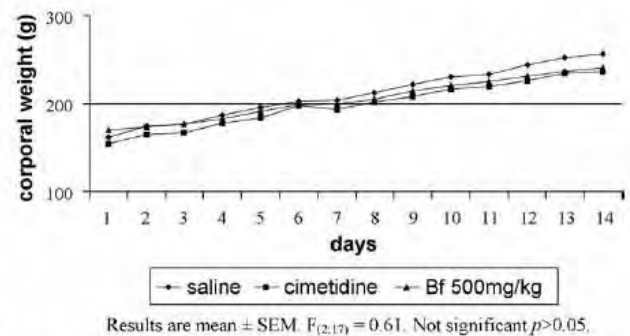


Fig. 3. Histological analyses of rat stomach treated with saline (10 mL/kg), cimetidine (100 mg/kg) or *Byrsonima fagifolia* (500 mg/kg), by PCNA immunohistochemistry immunostained with peroxidase method. Note the organization in the glandule, in #, showing the preferential area of PCNA expression, and the PCNA-positive nucleus (arrow).

reported that doses in the range 100–300 mg/kg is a multiple of traditional doses. We observed that the active constituents responsible for BF's protective action are concentrated in the ethyl acetate fraction rather than in the aqueous fraction which did not induce significant gastric protection at the same dose. The aqueous fraction from BF did not present gastroprotective action at the dose of 100 mg/kg, whereas the acetate fraction led to significant inhibitions of 48, 69 and 79% at respective doses of 50, 100 and 200 mg/kg (Table 1). Phytochemical analyses of the acetate fraction yielded gallic acid, methyl gallate, quercetin-3-O- β -D-glycopyranoside, quercetin-3-O- β -D-xylopyranoside, quercetin-3-O-(2''-galloyl)- β -D-glycopyranoside and quercetin-3-O-(2''-galloyl)- β -D-galactopyranoside. Thus, it is probable that the presence of these phenolic compounds in *Byrsonima fagifolia* may be involved in ulcer-preventing activity, since flavonoids possess important antiulcer activity in several experimental models of gastric ulceration (Deshpande et al., 2003).

Biological experiments may be designed with the objective of determining a specific effect. But the measured effect need not be the death of the animal or induction of any toxicity sign that interferes in the biological effect. Thus, part of the pharmacological evaluation of body weight taken daily before BF treatment indicated no toxicity symptoms in the animals treated with this extract, cimetidine or saline for 14 days (Fig. 4). At the end of the experiment, the relative weights of the vital organs were observed (heart, lung, liver, kidneys and spleen). None of the groups presented significant organ-weight difference from controls, suggesting no significant adverse effects at the dose utilized (Table 5). The 14-day oral BF



Results are mean \pm SEM. $F_{(2,17)} = 0.61$. Not significant $p > 0.05$.

Fig. 4. Effects on body weight of a single dose (500 mg/kg, p.o.)/day of methanolic extract from *Byrsonima fagifolia* (BF) administered for 14 consecutive days after ulcer formation. Results are mean \pm S.E.M. $F_{(2;17)} = 0.61$. Not significant $p > 0.05$.

treatment did not elicit changes in some serum biochemical parameters related to renal (urea and creatinine) and hepatic toxicity (AST and ALT) (Table 5).

Despite its beneficial action, the absence of BF toxicity was also accomplished without mutagenic effects. Table 6 shows the results of mutagenic activity in the Ames test for methanolic extract, aqueous and acetate fractions using TA98, TA97a (frameshift mutation), TA100 and TA102 (base-pair substitution) strains, with and without microsomal activation. The responses are described as revertants/plate and the mutagenic index is

Table 5

Effects on body and organ weights and serum biochemical parameters of a single dose (500 mg/kg, p.o.)/day of methanolic extract from *Byrsonima fagifolia* (BF) administered for 14 consecutive days after ulcer formation ($n = 6-7$)

Treatment (p.o.)	Body and organ weight						Serum biochemical parameters			
	Body	Kidney	Lungs	Heart	Liver	Spleen	ALT (UI/L)	AST (UI/L)	Urea (mg/dL)	Creatinine (mg/dL)
Control	256.7 \pm 6.0	1.8 \pm 0.1	1.55 \pm 0.1	1.01 \pm 0.0	7.10 \pm 0.2	0.67 \pm 0.1	158.7 \pm 13.6	241.7 \pm 10.7	48.8 \pm 1.8	0.6 \pm 0.1
Cimetidine	236.2 \pm 6.7	1.8 \pm 0.1	1.45 \pm 0.1	0.89 \pm 0.0	6.84 \pm 0.3	0.60 \pm 0.1	105.8 \pm 25.8	255.6 \pm 23.0	51.8 \pm 2.1	0.5 \pm 0.1
BF	241.5 \pm 5.4	1.7 \pm 0.1	1.40 \pm 0.1	0.98 \pm 0.1	6.58 \pm 0.2	0.58 \pm 0.1	105.4 \pm 3.9	255.7 \pm 19.6	49.2 \pm 4.3	0.5 \pm 0.1

Results are mean \pm S.E.M.; ANOVA followed by Dunnett's test. No significant differences $p > 0.05$.

Table 6
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 extract and fractions of *Byrsomima fagifolia*, at various doses, with (+S9) or without (-S9) metabolic activation

Treatment (mg/plate)	Revertants/plate in <i>Salmonella typhimurium</i> strains (M ± S.D.)							
	TA98		TA100		TA97a		TA102	
	-S9 ^a	+S9 ^b	-S9 ^c	+S9 ^b	-S9 ^a	+S9 ^b	-S9 ^d	+S9 ^b
MeOH extract								
0	23 ± 1.0	30 ± 3.1	142 ± 1.5	143 ± 6.0	148 ± 1.0	150 ± 7.1	290 ± 1.7	305 ± 7.0
0.81	22 ± 0.6 (0.9)	33 ± 4.5 (1.1)	113 ± 1.0 (0.8)	133 ± 4.5 (0.9)	148 ± 0.6 (1.0)	147 ± 7.5 (0.9)	278 ± 1.5 (0.9)	293 ± 6.6 (0.9)
1.21	23 ± 1.0 (1.0)	33 ± 10.8 (1.1)	102 ± 2.0 (0.7)	134 ± 7.5 (0.9)	149 ± 1.0 (1.0)	150 ± 7.4 (1.0)	273 ± 3.1 (0.9)	303 ± 22.3 (1.0)
1.61	26 ± 1.0 (1.1)	31 ± 2.1 (1.0)	95 ± 3.0 (0.7)	139 ± 6.0 (0.9)	151 ± 1.0 (1.0)	154 ± 4.4 (1.0)	279 ± 9.5 (0.9)	307 ± 19.9 (1.0)
3.22	28 ± 1.0 (1.2)	32 ± 1.5 (1.1)	99 ± 1.0 (0.7)	135 ± 10.8 (0.9)	153 ± 0.6 (1.0)	154 ± 7.6 (1.0)	284 ± 1.5 (1.0)	316 ± 17.5 (1.0)
6.44	29 ± 1.0 (1.3)	35 ± 11.5 (1.2)	97 ± 2.7 (0.7)	139 ± 6.0 (0.9)	154 ± 1.0 (1.0)	147 ± 9.6 (0.9)	277 ± 2.5 (0.9)	320 ± 31.5 (1.0)
Aqueous fraction								
0	23 ± 1.0	30 ± 3.1	142 ± 1.5	143 ± 6.0	148 ± 1.0	150 ± 7.1	290 ± 1.7	305 ± 7.0
0.21	22 ± 1.0 (1.0)	28 ± 6.0 (0.9)	133 ± 1.2 (0.9)	136 ± 7.9 (0.9)	148 ± 0.6 (1.0)	145 ± 5.3 (0.9)	275 ± 3.1 (0.9)	294 ± 10.4 (0.9)
0.42	23 ± 0.6 (1.1)	30 ± 4.2 (1.0)	—	—	148 ± 0.6 (1.0)	151 ± 7.6 (1.0)	—	—
0.83	25 ± 1.0 (1.1)	29 ± 2.2 (0.9)	151 ± 11.6 (1.0)	139 ± 4.5 (0.9)	152 ± 0.6 (1.0)	148 ± 4.0 (0.9)	284 ± 6.8 (1.0)	297 ± 11.8 (0.9)
1.25	26 ± 1.5 (1.2)	30 ± 4.0 (1.0)	147 ± 5.9 (1.0)	149 ± 3.1 (1.0)	156 ± 0.6 (1.1)	148 ± 6.0 (0.9)	287 ± 0.6 (1.0)	306 ± 6.0 (1.0)
2.66	27 ± 0.0 (1.2)	30 ± 4.1 (1.0)	144 ± 5.2 (1.0)	140 ± 4.0 (0.9)	157 ± 1.6 (1.1)	143 ± 4.4 (0.9)	283 ± 6.1 (1.0)	311 ± 11.6 (1.0)
Acetate fraction								
0	23 ± 1.0	30 ± 3.1	142 ± 1.5	143 ± 6.0	148 ± 1.0	150 ± 7.1	290 ± 1.7	305 ± 7.0
0.29	24 ± 1.0 (1.1)	34 ± 5.7 (1.1)	144 ± 0.6 (1.0)	142 ± 7.6 (0.9)	193 ± 4.2 (1.0)	160 ± 5.3 (1.1)	—	—
0.58	25 ± 0.6 (1.1)	41 ± 7.6 (1.4)	144 ± 5.2 (1.0)	149 ± 4.0 (1.0)	197 ± 2.3 (1.0)	169 ± 4.2 (1.1)	277 ± 9.1 (1.0)	303 ± 6.0 (1.0)
1.17	26 ± 1.0 (1.2)	42 ± 10.5 (1.4)	152 ± 3.5 (1.1)	145 ± 8.3 (1.0)	198 ± 0.6 (1.0)	178 ± 5.1 (1.2)	276 ± 0.6 (1.0)	323 ± 9.5 (1.1)
1.75	27 ± 0.6 (1.2)	44 ± 2.5 (1.5)	151 ± 5.0 (1.1)	153 ± 5.6 (1.1)	199 ± 0.6 (1.1)	179 ± 4.2 (1.2)	285 ± 0.6 (1.0)	311 ± 15.1 (1.0)
2.34	29 ± 1.0 (1.3)	43 ± 3.1 (1.4)	153 ± 4.1 (1.1)	151 ± 2.5 (1.1)	200 ± 2.1 (1.1)	179 ± 6.4 (1.2)	281 ± 1.7 (1.0)	321 ± 9.9 (1.1)
Positive control	498 ± 13.9	472 ± 25.8	757 ± 28.3	749 ± 74.7	700 ± 23.0	807 ± 19.4	1044 ± 66.1	1048 ± 81.4

MeOH: methanolic extract; 0- negative control (DMSO-100 µL/plate). Positive control: ^aNPD (4-nitro-o-phenylenediamine-10.0 µg/plate); ^b2-anthramine (1.25 µg/plate); ^csodium azide (1.25 µg/plate); ^dmitomycin (0.5 µg/plate). The values in parenthesis = mutagenic index.

Table 7

Effects of methanolic extract of *Byrsonima fagifolia* (BF) on antidiarrheal assay with castor oil in rats and gastrointestinal motility in mice

Treatment (p.o.)	Vehicle (10 mL/kg)	Loperamide (3 mg/kg)	BF (500 mg/kg)
Evacuation index (EI)	16.5 ± 1.1	1.00 ± 0.7**	0.7 ± 0.5**
Reduction (%)	–	94%	96%
Time until charcoal defecation (min)	198.6 ± 22.3	293.3 ± 6.7**	269.0 ± 12.2**
Reduction (%)	–	48%	36%

Results are mean ± S.E.M.; n = 7. ANOVA followed by Dunnett's test. **p < 0.01. $F_{(2;18)} = 71.9$ on antidiarrheal assay and $F_{(2;18)} = 10.5$ for gastrointestinal motility.

based on the values observed in negative control. All the results obtained revealed absence of mutagenicity. The Ames test is a widely accepted method to identify various chemicals and drugs that can cause gene mutations and has a high predictive value for *in vivo* carcinogenicity. The most common test strains are TA97a, TA98, TA100 and TA102 (Mortelmans and Zeiger, 2000). As shown in Table 6, the extract and fractions presented no mutagenicity in any of the strains used. The absence of a mutagenic response by plant extract or fractions against *Salmonella typhimurium* bacterial strains in the Ames assay is a positive step forward in determining the safe use of plants in traditional medicine.

Although the *Byrsonima fagifolia* has an antiulcer indication, confirmed in the present work, we also evaluated the antidiarrheal action also disseminated by traditional medicine. Castor oil increases peristaltic activity and alters the permeability of the intestinal mucosa (Palombo, 2006). In our assay with castor oil (Table 7) BF displayed significant activity against castor oil-induced diarrhea (96%) which was comparable to the antidiarrheal agent loperamide (94%). BF's antidiarrheal effect was also followed by reduced intestinal motility (36%). Both of these results confirmed the incontestable antidiarrheal effect of this specie claimed by folk medicine.

We also evaluated the antibacterial activity of BF and its fractions. In the course of the study acetate fraction from *Byrsonima fagifolia* was found to present the most antibacterial activity against the respective standard strains of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Helicobacter pylori*. The results showed that the MIC of acetate fraction against *Helicobacter pylori* or *Staphylococcus aureus* was 0.25 mg/mL. We conclude that ethyl acetate fraction has weak antimicrobial action.

4. Conclusions

The present study clearly demonstrates the gastroprotective and healing properties of the methanolic extract from *Byrsonima fagifolia*. The effects observed on chronic gastric lesions suggest influences on free-radical-scavenging properties, on endogenous sulphhydryls and an increase of mucus production. The substances responsible for the protection are probably phenolic compounds, mainly flavonoid glycosides, which are concentrated in the ethyl acetate fraction. This extract also presents antidiarrheal action and the absence of both toxicity and mutagenicity. These pharmacological properties of *Byrsonima fagifolia* render this species a reasonable candidate for further *in vivo* studies as a prospective therapeutic agent. In conclusion, this integrative research based on ethnopharmacological investigation, followed by the chemical, toxicological and pharmacological investigation of this Brazilian medicinal plant, confirmed and validated the popular and safe use of *Byrsonima fagifolia* as an antiulcer, healing and antidiarrheal agent.

Acknowledgements

We thank the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) for support to the Biota-Fapesp Program and to Capes and CNPq for grants.

References

- Agrawal, P.K., 1989. Carbon 13 NMR of Flavonoids. Elsevier, Amsterdam, p. 564.
- Amarquaye, A., Che, C.T., Bejar, E., Malone, M.H., Fong, H.H., 1994. A new glycolipid from *Byrsonima crassifolia*. *Planta Medica* 60, 85–86.
- Antonio, M.A., Souza Brito, A.R., 1998. Oral anti-inflammatory and anti-ulcerogenic activities of a hydroalcoholic extract and partitioned fractions of *Turnera ulmifolia* (Turneraceae). *Journal of Ethnopharmacology* 61, 15–28.
- Arrieta, J., Benitez, J., Flores, E., Castillo, C., Navarrete, A., 2003. Purification of gastroprotective triterpenoids from the stem bark of *Amphipterygium adstringens*: role of prostaglandins, sulphhydryls, nitric oxide and capsaicin-sensitive neurons. *Planta Medica* 69, 905–909.
- Azuma, K., Ippoushi, K., Nakayama, M., Ito, H., Higashio, H., Terao, J., 2000. Absorption of chlorogenic acid and caffeic acid in rats after oral administration. *Journal of Agriculture Food Chemistry* 48, 5496–5500.
- Behmer, O.A., Tolosa, E.M.C., Freitas Neto, A.G., 1976. Manual de técnicas para histologia normal e patológica. EDART—Editora da Universidade de São Paulo, p. 241.
- Bergonzelli, G.E., Donnicola, D., Porta, N., Corthésy-Theulaz, I.E., 2003. Essential oils as components of a diet-based approach to management of *Helicobacter* infection. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 47, 3240–3246.
- Bernstein, L., Kaldor, J., McCann, J., Pike, M.C., 1982. An empirical approach to the statistical analysis of mutagenesis data from the *Salmonella* test. *Mutation Research* 97, 267–281.
- Binutu, O.A., Cordell, G.A., 2000. Gallic acid derivatives from *Mezoneuron benthamianum* leaves. *Pharmacological Journal* 38, 284–286.
- Carvajal, A., Arias, L.H., Vega, E., Sánchez, J.A., Rodríguez, I.M., Ortega, P.G., Del Pozo, J.G., 2004. Gastroprotection during the administration of non-steroidal anti-inflammatory drugs. A drug-utilization study. *European Journal Clinical Pharmacology* 60, 439–444.
- Croci, T., Emonds-ALT, X., Manara, L., 1994. SR 48968 selectively prevents faecal excretion following activation of tachykinin NK2 receptors in rats. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 46, 383–385.
- Deshpande, S.S., Shah, G.B., Parmar, N.S., 2003. Antiulcer activity of *Tephrosia purpurea* in rats. *Indian Journal Pharmacology* 35, 168–172.
- Finn, P.E., Purnell, P., Pilkington, G.J., 1996. Effect of histamine and the H2 antagonist cimetidine on the growth and migration of human neoplastic glioma. *Neuropathology and Applied Neurobiology* 22, 559.
- Galati, E.M., Mondello, M.R., Giuffrida, D., Dugo, G., Miceli, N., Pergolizzi, S., Taviano, M.F., 2003. Chemical characterization and biological effects of Sicilian *Opuntia ficus indica* (L.) Mill. Fruit juice: antioxidant and antiulcerogenic activity. *Journal of Agriculture Food Chemistry* 51, 4903–4908.
- Green, I.C., Wagner, D.A., Glogowski, J., Skipper, P.L., Wishnok, J.S., Tannenbaum, S.R., 1982. Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N] nitrate in biological fluids. *Analytical Biochemistry* 126, 131–138.
- Grob, N.G., 2004. Peptic ulcer in twenty-century of America. *New Jersey Medicine* 101, 19–28.
- Gyires, K., 2005. Gastric mucosal protection: from prostaglandins to gene-therapy. *Current Medicinal Chemistry* 12, 203–215.
- Harborne, J.B., 1996. The Flavonoids: Advances in Research Since 1986. Chapman & Hall, New York, p. 676.
- Ishihara, M., Ito, M., 2002. Influence of aging on gastric ulcer healing activities of cimetidine and omeprazole. *European Journal of Pharmacology* 31, 209–215.
- Jung, H.K., Lee, K.E., Chu, S.H., Yi, S.Y., 2001. Reactive oxygen species activity, mucosal lipoperoxidation and glutathione in *Helicobacter pylori*-infected gastric mucosa. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 16, 1336–1340.
- Kimura, M., Goto, S., Lhara, Y., Wada, A., Yahiro, K., Niidome, T., Aoyagi, H., Hirayama, T., Kondo, T., 2001. Impairment of glutathione metabolism in human gastric epithelial cells treated with vacuolating cytotoxin from *Helicobacter pylori*. *Microbial Pathogenesis* 31, 29–36.
- Kosek, M., Bern, C., Guerrant, R.L., 2003. The global burden of diarrhoeal disease, as estimated from studies published between 1992 and 2000. *Bulletin World Health Organization* 81, 197–204.
- Kwicien, S., Brzowski, T., Konturek, S.J., 2002. Effects of reactive oxygen species action on gastric mucosa in various models of mucosal injury. *Journal of Physiology and Pharmacology* 53, 39–50.
- Levine, R.J., 1971. A method for rapid production of stress ulcers in rats. In: Pfeiffer, C.J. (Ed.), *Peptic Ulcer*. Munksgaard, Copenhagen, pp. 92–97.
- Loibl, S., Bratengeier, J., Farines, V., Von Minckwitz, G., Spankuch, B., Shini-Kerth, V., Nepveu, F., Strebhardt, K., Kaufmann, M., 2006. Investigations on the inducible and endothelial nitric oxide synthases in human breast cancer cell line MCF-7—estrogen has an influence on e-NOS, but not on i-NOS. *Pathology-Research and Practice* 202, 1–7.
- Lopes, F.C.M., Calvo, T.R., Vilegas, W., Carlos, I.Z., 2005. Inhibition of hydrogen peroxide, nitric oxide and TNF- α production in peritoneal macrophages by ethyl

- acetate fraction from *Alchornea glandulosa*. Biological and Pharmaceutical Bulletin 28, 1726–1730.
- Maron, D.M., Ames, B.N., 1983. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. Mutation Research 113, 173–215.
- Marona, H.R.N., Lucchesi, M.B.B., 2004. Protocol to refine intestinal motility test in mice. Royal Society of Medicine Press 38, 257–260.
- Maton, P.N., 2005. Prevention of stress-related mucosal bleeding with proton-pump inhibitors. Alimentary Pharmacology and Therapeutics 22, 45–52.
- Mizui, T., Doteuchi, M., 1983. Effect of polyamines on acidified ethanol-induced gastric lesions in rats. Japanese Journal of Pharmacology 33, 934–945.
- Morimoto, Y., Shimohara, K., Oshima, S., Sukamoto, T., 1991. Effects of the new anti-ulcer agent KB-5492 on experimental gastric mucosal lesions and gastric mucosal defensive factors, as compared to those of teprenone and cimetidine. Japanese Journal of Pharmacology 57, 495–505.
- Mortelmans, K., Zeiger, E., 2000. The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. Mutation Research 455, 29–60.
- Nanji, A.A., Tahan, S.R., 1996. Association between endothelial cell proliferation and pathologic changes in experimental alcoholic liver disease. Toxicological and Applied Pharmacology 140, 101–107.
- Okabe, S., Amagase, K., 2005. An overview of acetic acid ulcer models—the history and state of the art of peptic ulcer research. Biological and Pharmaceutical Bulletin 28, 1321–1341.
- Okamoto, R., Watanabe, M., 2004. Molecular and clinical basis for the regeneration of human gastrointestinal epithelia. Journal of Gastroenterology 39, 1–6.
- Olfert, E.D., Cross, B.M., McWilliam, A.A., 1993. Guide to the Care and Use of Experimental Animals. Canadian Council on Animal Care Co., Ontario, p. 213.
- Palombo, E.A., 2006. Phytochemicals from traditional medicinal plants used in the treatment of diarrhoea: modes of action and effects on intestinal function. Phytotherapy Research 20, 717–724.
- Peskar, B.M., Maricic, N., 1998. Role of prostaglandins in gastroprotection. Digestion Disease Sciences 43, 235–295.
- Potterat, O., 1997. Antioxidants and free radical scavengers of natural origin. Current Organic Chemistry 1, 415–440.
- Puscas, I., Puscas, C., Coltau, M., Pasca, R., Torres, J., Márquez, M., Herrero, E., Fillat, O., Ortiz, J.A., 1997. Comparative study of the safety and efficacy of ebrotidine versus ranitidine and placebo in the prevention of piroxicam-induced gastroduodenal lesions. Arzneimittelforschung 47, 568–572.
- Rastogi, L., Patnaik, G.K., Dikshit, M., 1998. Free radicals and antioxidant status following pylorus ligation induced gastric mucosal injury in rats. Pharmacological Research 38, 125–132.
- Repetto, M.G., Llesuy, S.F., 2002. Antioxidant properties of natural compounds used in popular medicine for gastric ulcers. Brazilian Journal of Medical and Biological Research 35, 523–534.
- Ribeiro, A.Q., Sevalho, G., César, C.C., 2006. The use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs and the occurrence of gastric lesions among patients undergoing upper endoscopy in a university hospital in Brazil. Clinics 61, 409–416.
- Salvat, A., Antonacci, L., Fortunato, R.H., Suarez, E.Y., Godoy, H.M., 2004. Antimicrobial activity in methanolic extracts of several plant species from northern Argentina. Phytomedicine 11, 230–234.
- Sannomiya, M., Cardoso, C.R., Figueiredo, M.E., Rodrigues, C.M., dos Santos, L.C., dos Santos, F.V., Serpeloni, J.M., Cólus, I.M., Vilegas, W., Varanda, E.A., 2007. Mutagenic evaluation and chemical investigation of *Byrsonima intermedia* A. Juss. leaf extracts. Journal of Ethnopharmacology 112, 319–326.
- Sannomiya, M., Fonseca, V.B., da Silva, M.A., Rocha, L.R., Dos Santos, L.C., Hiruma-Lima, C.A., Souza Brito, A.R., Vilegas, W., 2005. Flavonoids and antiulcerogenic activity from *Byrsonima crassa* leaves extracts. Journal of Ethnopharmacology 97, 1–6.
- Santos, F.V., Colus, I.M.S., Silva, M.A., Vilegas, W., Varanda, E.A., 2006. Assessment of DNA damage induced by extracts and fractions of *Strychnos pseudoquina*, a Brazilian medicinal plant with antiulcerogenic activity. Food and Chemical Toxicology 44, 1585–1589.
- Schmeda-Hirschmann, G., Yesilada, E., 2005. Traditional medicine and gastroprotective crude drugs. Journal of Ethnopharmacology 100, 61–66.
- Shah, A.M., 2005. Divergent roles of endothelial nitric oxide synthase in cardiac hypertrophy and chamber dilatation? Cardiovascular Research 66, 421–422.
- Silva, E.M., Hiruma-Lima, C.A., Lolis, S.F., 2000. Levantamento etnofarmacológico no município de Porto Nacional, Tocantins. XVI Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil. Recife, PE, Brazil. Conference Proceeding, 106.
- Szabo, S., Trier, J.S., Frank, P.W., 1981. Sulfhydryl compounds may mediate gastric protection. Science 214, 200–202.
- Szelenyi, I., Thieme, K., 1978. Distention ulcer as a model for testing of drugs for ulcerogenic side effects. Archives of Toxicology 41, 99–105.
- Takagi, K., Okabe, S., Saziki, R., 1969. A new method for the production of chronic gastric ulcer in rats and the effect of several drugs on its healing. Japanese Journal of Pharmacology 19, 418–426.
- Tamir, S., Tannenbaum, S.R., 1996. The role of nitric oxide (NO) in the carcinogenic process. Biochimica et Biophysica Acta 1288, 31–36.
- Tarnawski, A., Szabo, I.L., Husain, S.S., Soreghan, B., 2001. Regeneration of gastric mucosa during ulcer healing is triggered by growth factors and signal transduction pathways. Journal of Physiology Paris 95, 337–344.
- Vacca, L.L., 1985. Laboratory Manual of Histochemistry. Raven Press, New York, p. 578.
- Wagner, H., Bladt, H., Zgainski, E.M., 1984. Plant Drug Analysis. Springer, Berlin, p. 320.
- Wallace, J.L., Granger, D.N., 1996. The cellular and molecular basis of gastric mucosal defense. Federation of American Societies for Experimental Biology Journal 10, 731–740.
- Wong, W.M., Wright, N.A., 1999. Cell proliferation in gastrointestinal mucosa. Journal of Clinical Pathology, 321–333.

ANEXOS

ANEXO I. Ensaios de mutagenicidade:

A. Soluções e meios de cultura:

- Caldo nutriente:

Meio Oxoid.....0,75g

Água destilada q.s.p.....30mL

Autoclavar (121 °C, 15 minutos).

- Top agar:

Agar.....1,2g

NaCl.....1,0g

água destilada q.s.p.....200mL

Autoclavar (121 °C, 15 minutos).

- Solução de Histidina/Biotina (0,5 mM):

Biotina.....0,00247g

Histidina.....0,00192g

Água destilada (45 °C) q.s.p.....20mL

Autoclavar (121 °C, 15 minutos).

Agar mínimo glicosado (AGM):

Agar.....7,5g

Água destilada.....465mL

Glicose 40%: 50mL/1L de meio (45 mL água destilada + 20g glicose); VB: 20 mL/1 L de meio.

Autoclavar (121 °C, 15 minutos).

- VB (Vogel Bonner E):

Sulfato de magnésio.....0,75g

Ácido cítrico.....7,5g

Fosfato de potássio dibásico.....37,5g

Fosfato de sódio e amônio.....13,13g

Água destilada (45 °C).....50,25mL

Dissolver os reagentes (1-4) sequencialmente na água, mantendo a temperatura em 45°C (banho quente).

Autoclavar (121 °C, 15 minutos).

- Tampão fosfato (0,2 M):

Solução estoque A:

2,84g (Na₂HPO₄).....100mL (água destilada)

Solução estoque B:

2,76g (NaH₂PO₄).....100mL água destilada)

Solução de uso: Misturar 30 mL da solução A e 7mL da solução B. Ajustar o pH (7.4). Autoclavar (121 °C, 15 minutos).

- Solução de MgCl (0,4 M):

MgCl₂.6H₂O.....8,13g

H₂O destilada.....100mL

Autoclavar (121 °C, 15 minutos).

- Solução de KCl (1,65M):

KCl.....12,3g

H₂O.....100mL

Autoclavar (121 °C, 15 minutos).

- Solução de glicose 6-fosfato (G-6-P) 1M:

G-6-P.....2,821g

H₂O destilada (estéril).....10 mL

- Solução NAPD (0.1 M):

NAPD.....0,7654g

H₂O destilada (estéril).....10mL

- Solução de tetraciclina:

HCl 0,02N (14 µL HCl fumegante (Merck) – 10 mL água estéril)

0,008g tetraciclina – 1 mL HCl 0,02N

Filtrar a solução de HCl (Millipore) antes de acrescentar o antibiótico; trabalhar na capela.

B. Controles positivos utilizados no Teste de Ames:

- Azida sódica: (25µL para TA 100)

10 mL água.....0,0005g

- NPD: (50µL – TA98)

5mL DMSO.....0,001g

- Antramine: (25µL – TA100, TA98, ensaios com S9)

10mL DMSO.....0,0003g

C. Solução de congelamento das linhagens de *Salmonella typhimurium* utilizadas no Teste de Ames:

1mL cultura

0,2mL DMSO

Estocar por 24 h à -20°C e passar para - 80 °C.

D. Cultura (estoque)

- 30mL de caldo nutriente;

- Linhagens (TA): 95 µL de ampicilina (8mg/mL);

- Acrescentar o antibiótico após a esterilização dos meios.

E. Controle e testes das linhagens de *Salmonella typhimurium* utilizadas no Teste de Ames:

E.1. SENSIBILIDADE AO CRISTAL VIOLETA:

Realizar o teste com apenas uma linhagem por placa;

Agar nutriente (CN + 1,5% agar);

Solução de cristal violeta 0,1% (0,01g/10 mL de água estéril);

Semear com Drigalski 0,1mL de suspensão bacteriana; utilizar 3 discos estéreis.

Utilizar a técnica de difusão em disco, como antibiograma, 10µL de solução/disco.

E.2. RESISTÊNCIA À AMPICILINA:

Em placa de AGM, usando alça de semeadura, fazer um “V” com o antibiótico e outro perpendicularmente, outro com a cultura (2 linhagens /placa).

E.3. REQUERIMENTO DE BIOTINA:

Esparramar 0,1mL da solução de biotina com drigalski, esperar secar e fazer estrias com a cultura (2 linhagens/placa).

E.4. REQUERIMENTO DE HISTIDINA/BIOTINA:

- 2 linhagens por placa;

- AMG;

- BIOTINA (0,5 mM): 0,0012g – 100mL água destilada

- HISTIDINA (0,5%): 0,015g – 3 mL água destilada

Autoclavar as soluções de aminoácidos. Com o mesmo procedimento do teste E.4., nesse caso, colocando primeiro a biotina.

E.5. SENSIBILIDADE À LUZ ULTRAVIOLETA:

- 30 cm por 8 segundos;

Uma linhagem por placa (100µl de cultura, com drigalski); Deixar as placas abertas.

ANEXO II. Ensaio com cultivos celulares:

A. Soluções e meios de cultura:

- **Meio DMEM:** O meio de cultura é composto de HAM – FIO (10g) - Sigma, DMEM (10g) -Sigma, NaHCO₃ (1,2g), HEPES (2,38g), penicilina (0,06g) e estreptomicina (0,10g) para 2 litros de água *Milli Q*, com pH final entre 7,2 e 7,4. O meio de cultura foi esterilizado em membrana filtrante (0,22µ) e aliqotado para ser estocado sob congelamento (-20°C).

- Solução de ácido tricloroacético 10%:

Para a preparação de 1 litro de solução:

Ácido tricloroacético.....100g

Água destilada.....1000mL.

Dissolver bem o ácido em água e armazenar a 4°C.

- Solução de sulforodamina-B 0,4% em ácido acético 1%:

Para a preparação de 100mL de solução:

Sulforodamina-B.....0,4g

Ácido acético 1%.....100mL.

Dissolver bem e armazenar em temperatura ambiente.

- Tampão TRIS Base 10mM, pH 10:

Para a preparação de 1000mL de solução:

TRIS Base.....1,21g

Água destilada.....1000mL.

Dissolver bem, ajustar o pH com NaOH 1N e armazenar em temperatura ambiente.

- Solução NaOH 10N:

Para a preparação de 1000mL de solução:

TRIS Base.....1,21g

Água destilada.....1000mL. Dissolver bem e armazenar em temperatura ambiente.

ANEXO III. Ensaios de atividade antimicrobiana:

A. Soluções e meios de cultura:

- Meio Mueller-Hinton (composição e preparo)

- Infusão de carne 30%
- Caseína hidrolisada 1,75%
- Amido 0,15%
- agar 1,7%

Esterelizar em autoclave por 15 minutos (121 °C). Foram utilizadas placas de Petri plásticas, descartáveis e de fundo chato, atingindo uma espessura máxima de 4mm de agar. O pH (entre 7,2-7,4) deve ser confirmado com eletrodo de pHmetro comum, devidamente calibrado, em contato com a superfície de uma pequena porção de meio solidificado e macerado. As placas devem ser resfriadas em temperatura ambiente e armazenadas sob refrigeração (4 °C). Utilizar até 7 dias após cada preparação. Cada lote de placas deve ser submetida ao teste de esterilidade, que consiste em incubação a 30-35 °C em uma média de 48h para comprovação da ausência de crescimento bacteriano ou fúngico.

ANEXO IV. Ensaios de atividade anti-*Leishmania*

- Meio LIT – Infusão de triptose e fígado (composição e preparo):

- Água destilada 1000mL
- Infusão de fígado 5g
- Triptose 25g
- Fosfato de sódio (Na₂HPO₄) 40g
- Cloreto de potássio (KCl) 2g
- Glicose 2g
- Cloreto de sódio 20g
- Hemina 125mg
- Soro fetal bovino 100mL
- Penicilina 50u/mL
- Estreptomicina 100µg/mL

Acertar o pH para 7,2. Filtrar em membrana filtrante 0,22µm. Aliquotar e manter refrigerado a 4 °C.

ANEXO V. Análises estatísticas:

Análises de regressão linear: Através da análise de regressão linear simples é possível estabelecer uma função matemática para a descrição e compreensão da relação entre duas variáveis em estudo (concentração das substâncias testadas e absorvâncias/vialidades obtidas nos ensaios, além de prever ou projetar novas observações, ou ainda ajustar e controlar processos).

O valor do coeficiente de correlação (R-múltiplo) permite conhecer a força da relação entre as variáveis e quanto mais próximo a 1, maior a força de correlação. O R-quadrado (coeficiente de determinação) indica a proporção da variação total da absorvância, sendo explicada na variação das concentrações das substâncias testadas. Através do erro padrão se pode medir a dispersão dos desvios ao redor da reta de regressão informando quão grandes são os erros da estimativa. Para a análise do processo de regressão, se assume como hipótese nula (Ho) a rejeição da regressão, sendo $a=0$ e $b=0$, analisando dessa maneira a existência e aceitação da regressão linear, além de observar a sua variância. A decisão de aceitar ou não a regressão é determinada comparando-se o valor do F de significação (p-value F observado ou a probabilidade $P(F > F_{\text{observado}})$) com o nível de significância adotado. Quando F de significação for menor que o nível de significância do teste, a hipótese nula é rejeitada e a regressão linear é aceita. O coeficiente \underline{a} da equação da reta de regressão linear ($y = \underline{a} + \underline{b}x$) é representado na tabela pela interseção e \underline{b} pelo coeficiente de concentração. O erro padrão representa os erros padrões de cada coeficiente. Através do Stat t (estatística t) se pode aceitar ou rejeitar os valores dos coeficientes de regressão. Quando os valores do t observado forem menores que o valor do t crítico (2,12 – obtido na tabela de distribuição t), a hipótese nula é rejeitada e os coeficientes são aceitos. O valor-P ou valor da probabilidade $P(t > t_{\text{observado}})$ permite decidir sobre a aceitação ou rejeição da hipótese nula para os coeficientes da reta. Quando o valor-P for menor que o nível de significância a hipótese nula é rejeitada. Os resultados dos resíduos demonstram as absorvâncias previstas pela reta de regressão linear para cada observação, além de demonstrar a diferença entre o valor observado e projetado pela reta de regressão (resíduo).

Análises de variância: A análise de variância é um procedimento estatístico para análise de testes de hipótese e a comparação de médias de dois ou mais tratamentos de uma amostra. Para a análise de variância se assume como hipótese nula (Ho) a inexistência de diferença entre os tratamentos sob análise, ou seja, os grupos sob análise não são significativamente diferentes entre si. A comparação entre os valores de F observado e F crítico (obtido na tabela de distribuição F), permite decidir sobre a aceitação ou rejeição de Ho para os diferentes tratamentos da amostra. Quando o F observado for menor que o F crítico, a hipótese nula deve ser aceita e, portanto, não há diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos da amostra. A avaliação da hipótese nula pode ser realizada através do valor-P ou valor de probabilidade $P(F > F_{\text{observado}})$. Se o valor-P for menor que o nível de significância adotado para o teste ($\alpha = 0,05$), a hipótese nula é rejeitada.

Teste de Dunnett: O teste de Dunnett serve para comparações múltiplas onde apenas um tratamento serve de referência, quer dizer, deseja-se apenas comparar todos com apenas um. Por exemplo, o tratamento padrão (pode ser chamado de controle, tradicional...) não havendo interesse na comparação dos demais tratamentos entre si. O valor da DMS para o teste de Dunnett é obtido pela seguinte expressão:

$$DMS = t(v_r; \alpha) \cdot \sqrt{\frac{2 \cdot QMR}{r}}$$

Onde:

- v= graus de liberdade para tratamentos;
- α = graus de liberdade para o resíduo;

O teste de Dunnett é semelhante ao teste t de Student, exceto pelo valor de q, aqui ajustado para um maior número de tratamentos. Toda estimativa de contraste em módulo maior do que a diferença mínima significativa (DMS) resultará em um valor significativo no nível de significância α .

ANEXO VI. Interpretação da regressão linear e ANOVA para os ensaios de citotoxicidade:

1. ISATINA

a) 24 horas de incubação:

- Correlação entre as variáveis: 96,4%;
- Erro padrão de regressão: 5,82%;
- Análise de regressão aceita – F de significação (0,001875) é menor que o nível de significância adotado (0,05);
- Equação da reta: $y = 91,61013443 - (-0,80892491)x$;
- Erro padrão para coeficiente \underline{a} (3,265155469) e \underline{b} (0,110854805);

Os coeficientes \underline{a} e \underline{b} são aceitos, pois os valores-P ($9,6 \times 10^{-6}$ e 0,001875, respectivamente) são menores que o nível de significância adotado (0,05). Portanto, a hipótese nula ($H_0: a = 0$ e $b = 0$) é rejeitada. Através da Estatística t, foi possível rejeitar a hipótese nula, pois o t observado para os coeficientes \underline{a} e \underline{b} (28,0569 e 7,297, respectivamente) são maiores que o t crítico adotado (2,12 – tabela de distribuição t), aceitando os valores desses coeficientes.

b) 48 horas de incubação:

- Correlação entre as variáveis: 97,6%;
- Erro padrão de regressão: 4,97%;
- Análise de regressão aceita – F de significação (0,000831) é menor que o nível de significância adotado (0,05);
- Equação da reta: $y = 92,0839903 - (-0,855523879)x$;
- Erro padrão para coeficiente \underline{a} (2,788434562) e \underline{b} (0,094669725);

Os coeficientes \underline{a} e \underline{b} são aceitos, pois os valores-P ($5,1 \times 10^{-6}$ e 0,000831, respectivamente) são menores que o nível de significância adotado (0,05). Portanto, a hipótese nula ($H_0: a = 0$ e $b = 0$) é rejeitada. Através da Estatística t, foi possível rejeitar a hipótese nula, pois o t observado para os coeficientes \underline{a} e \underline{b} (33,02354 e 9,03693, respectivamente) são maiores que o t crítico adotado (2,12 – tabela de distribuição t), aceitando os valores desses coeficientes.

c) 72 horas de incubação:

- Correlação entre as variáveis: 96,9%;
- Erro padrão de regressão: 6,53%;
- Análise de regressão aceita – F de significação (0,001338) é menor que o nível de significância adotado (0,05);
- Equação da reta: $y = 91,45270832 - (-0,992702312)x$;
- Erro padrão para coeficiente \underline{a} (3,665340903) e \underline{b} (0,124441441);

Os coeficientes \underline{a} e \underline{b} são aceitos, pois os valores-P ($1,53 \times 10^{-5}$ e 0,001338, respectivamente) são menores que o nível de significância adotado (0,05). Portanto, a hipótese nula ($H_0: a = 0$ e $b = 0$) é rejeitada. Através da Estatística t, foi possível rejeitar a hipótese nula, pois o t observado para os coeficientes \underline{a} e \underline{b} (24,95067 e 7,97726, respectivamente) são maiores que o t crítico adotado (2,12 – tabela de distribuição t), aceitando os valores desses coeficientes.

2. ÍNDIGO

a) 24 horas de incubação:

- Correlação entre as variáveis: 91,9%;
- Erro padrão de regressão: 2,24%;
- Análise de regressão aceita – F de significação (0,000467) é menor que o nível de significância adotado (0,05);
- Equação da reta: $y = 95,65821376 - (-0,029237952)x$;
- Erro padrão para coeficiente \underline{a} (0,914871729) e \underline{b} (0,004753824);

Os coeficientes \underline{a} e \underline{b} são aceitos, pois os valores-P ($1,93 \times 10^{-12}$ e 0,000467, respectivamente) são menores que o nível de significância adotado (0,05). Portanto, a hipótese nula ($H_0: a = 0$ e $b = 0$) é rejeitada. Através da Estatística t, foi possível rejeitar a hipótese nula, pois o t observado para os coeficientes \underline{a} e \underline{b} (104,5592 e 6,15039, respectivamente) são maiores que o t crítico adotado (2,12 – tabela de distribuição t), aceitando os valores desses coeficientes.

b) 48 horas de incubação:

- Correlação entre as variáveis: 96,5%;
- Erro padrão de regressão: 1,69%;
- Análise de regressão aceita – F de significação ($2,43 \times 10^{-5}$) é menor que o nível de significância adotado (0,05);
- Equação da reta: $y = 97,39407947 - (-0,035183933)x$;
- Erro padrão para coeficiente a (0,690482299) e b (0,003587867);

Os coeficientes \underline{a} e \underline{b} são aceitos, pois os valores-P ($2,37 \times 10^{-13}$ e $2,43 \times 10^{-5}$, respectivamente) são menores que o nível de significância adotado (0,05). Portanto, a hipótese nula ($H_0: a = 0$ e $b = 0$) é rejeitada. Através da Estatística t, foi possível rejeitar a hipótese nula, pois o t observado para os coeficientes \underline{a} e \underline{b} (141,0522 e 9,80636, respectivamente) são maiores que o t crítico adotado (2,12 – tabela de distribuição t), aceitando os valores desses coeficientes.

c) 72 horas de incubação:

- Correlação entre as variáveis: 96,7%;
- Erro padrão de regressão: 2,41%;
- Análise de regressão aceita – F de significação ($1,98 \times 10^{-5}$) é menor que o nível de significância adotado (0,05);
- Equação da reta: $y = 97,5041007 - (-0,051738687)x$;
- Erro padrão para coeficiente \underline{a} (0,983739612) e \underline{b} (0,005111684);

Os coeficientes \underline{a} e \underline{b} são aceitos, pois os valores-P ($2,8 \times 10^{-12}$ e $1,98 \times 10^{-5}$, respectivamente) são menores que o nível de significância adotado (0,05). Portanto, a hipótese nula ($H_0: a = 0$ e $b = 0$) é rejeitada. Através da Estatística t, foi possível rejeitar a hipótese nula, pois o t observado para os coeficientes \underline{a} e \underline{b} (99,11576 e

10,1217, respectivamente) são maiores que o t crítico adotado (2,12 – tabela de distribuição t), aceitando os valores desses coeficientes.

3. AMENTOFILAVONA

a) 24 horas de incubação:

- Correlação entre as variáveis: 95,8%;
- Erro padrão de regressão: 3,45%;
- Análise de regressão aceita – F de significação ($4,73 \times 10^{-5}$) é menor que o nível de significância adotado (0,05);
- Equação da reta: $y = 93,19146116 - (-0,091479922)x$;
- Erro padrão para coeficiente \underline{a} (1,987208533) e \underline{b} (0,010325885);

Os coeficientes \underline{a} e \underline{b} são aceitos, pois os valores-P ($5,24 \times 10^{-10}$ e $4,73 \times 10^{-5}$, respectivamente) são menores que o nível de significância adotado (0,05). Portanto, a hipótese nula ($H_0: a = 0$ e $b = 0$) é rejeitada. Através da Estatística t, foi possível rejeitar a hipótese nula, pois o t observado para os coeficientes \underline{a} e \underline{b} (46,89566 e 8,85928, respectivamente) são maiores que o t crítico adotado (2,12 – tabela de distribuição t), aceitando os valores desses coeficientes.

b) 48 horas de incubação:

- Correlação entre as variáveis: 98,2%;
- Erro padrão de regressão: 3,45%;
- Análise de regressão aceita – F de significação ($2,42 \times 10^{-5}$) é menor que o nível de significância adotado (0,05);
- Equação da reta: $y = 96,82293882 - (-0,101201134)x$;
- Erro padrão para coeficiente a (1,406765912) e b (0,007309803);

Os coeficientes \underline{a} e \underline{b} são aceitos, pois os valores-P ($3,59 \times 10^{-11}$ e $2,24 \times 10^{-5}$, respectivamente) são menores que o nível de significância adotado (0,05). Portanto, a hipótese nula ($H_0: a = 0$ e $b = 0$) é rejeitada. Através da Estatística t, foi possível rejeitar a hipótese nula, pois o t observado para os coeficientes \underline{a} e \underline{b} (68,82662 e 13,8446, respectivamente) são maiores que o t crítico adotado (2,12 – tabela de distribuição t), aceitando os valores desses coeficientes.

c) 72 horas de incubação:

- Correlação entre as variáveis: 98,1%;
- Erro padrão de regressão: 4,90%;
- Análise de regressão aceita – F de significação ($2,73 \times 10^{-5}$) é menor que o nível de significância adotado (0,05);
- Equação da reta: $y = 95,65115378 - (-0,141110716)x$;
- Erro padrão para coeficiente \underline{a} (1,996686903) e \underline{b} (0,0010375136);

Os coeficientes \underline{a} e \underline{b} são aceitos, pois os valores-P ($4,52 \times 10^{-10}$ e $2,73 \times 10^{-5}$, respectivamente) são menores que o nível de significância adotado (0,05). Portanto, a hipótese nula ($H_0: a = 0$ e $b = 0$) é rejeitada. Através da Estatística t, foi possível rejeitar a hipótese nula, pois o t observado para os coeficientes \underline{a} e \underline{b} (47,90493 e 13,6009, respectivamente) são maiores que o t crítico adotado (2,12 – tabela de distribuição t), aceitando os valores desses coeficientes.

4. KAEMPFEROL-3,7-DIRAMINOSÍDEO

a) 24 horas de incubação:

- Correlação entre as variáveis: 94,7%;
- Erro padrão de regressão: 5,42%;
- Análise de regressão aceita – F de significação (0,000102) é menor que o nível de significância adotado (0,05);
- Equação da reta: $y = 97,911617297 - (-0,090297718)x$;
- Erro padrão para coeficiente \underline{a} (2,210048204) e \underline{b} (0,011488399);

Os coeficientes \underline{a} e \underline{b} são aceitos, pois os valores-P ($7,79 \times 10^{-10}$ e 0,000102, respectivamente) são menores que o nível de significância adotado (0,05). Portanto, a hipótese nula ($H_0: a = 0$ e $b = 0$) é rejeitada. Através da Estatística t, foi possível rejeitar a hipótese nula, pois o t observado para os coeficientes \underline{a} e \underline{b} (44,30499 e 7,86305, respectivamente) são maiores que o t crítico adotado (2,12 – tabela de distribuição t), aceitando os valores desses coeficientes.

b) 48 horas de incubação:

- Correlação entre as variáveis: 97,4%;
- Erro padrão de regressão: 4,68%;
- Análise de regressão aceita – F de significação ($8,85 \times 10^{-6}$) é menor que o nível de significância adotado (0,05);
- Equação da reta: $y = 98,61049655 - (-0,113236091)x$;
- Erro padrão para coeficiente a (1,908023809) e b (0,009914427);

Os coeficientes \underline{a} e \underline{b} são aceitos, pois os valores-P ($2,66 \times 10^{-10}$ e $8,85 \times 10^{-6}$, respectivamente) são menores que o nível de significância adotado (0,05). Portanto, a hipótese nula ($H_0: a = 0$ e $b = 0$) é rejeitada. Através da Estatística t, foi possível rejeitar a hipótese nula, pois o t observado para os coeficientes \underline{a} e \underline{b} (51,68201 e 11,3236091, respectivamente) são maiores que o t crítico adotado (2,12 – tabela de distribuição t), aceitando os valores desses coeficientes.

c) 72 horas de incubação:

- Correlação entre as variáveis: 99,1%;
- Erro padrão de regressão: 4,90%;
- Análise de regressão aceita – F de significação ($2,23 \times 10^{-7}$) é menor que o nível de significância adotado (0,05);
- Equação da reta: $y = 96,08455875 - (-0,102259842)x$;
- Erro padrão para coeficiente \underline{a} (1,002703231) e \underline{b} (0,005210222);

Os coeficientes \underline{a} e \underline{b} são aceitos, pois os valores-P ($3,55 \times 10^{-12}$ e $2,23 \times 10^{-7}$, respectivamente) são menores que o nível de significância adotado (0,05). Portanto, a hipótese nula ($H_0: a = 0$ e $b = 0$) é rejeitada. Através da Estatística t, foi possível rejeitar a hipótese nula, pois o t observado para os coeficientes \underline{a} e \underline{b} (95,82552 e 19,6228, respectivamente) são maiores que o t crítico adotado (2,12 – tabela de distribuição t), aceitando os valores desses coeficientes.

5. RUTINA

a) 24 horas de incubação:

- Correlação entre as variáveis: 98,5%;
- Erro padrão de regressão: 2,67%;
- Análise de regressão aceita – F de significação ($1,16 \times 10^{-6}$) é menor que o nível de significância adotado (0,05);
- Equação da reta: $y = 100,7924429 - (-0,087272348)x$;

- Erro padrão para coeficiente \underline{a} (1,0808014) e \underline{b} (0,005655525);

Os coeficientes \underline{a} e \underline{b} são aceitos, pois os valores-P ($4,51 \times 10^{-12}$ e $1,16 \times 10^{-6}$, respectivamente) são menores que o nível de significância adotado (0,05). Portanto, a hipótese nula ($H_0: a = 0$ e $b = 0$) é rejeitada. Através da Estatística t, foi possível rejeitar a hipótese nula, pois o t observado para os coeficientes \underline{a} e \underline{b} (92,600595 e 15,4313, respectivamente) são maiores que o t crítico adotado (2,12 – tabela de distribuição t), aceitando os valores desses coeficientes.

b) 48 horas de incubação:

- Correlação entre as variáveis: 98,9%;

- Erro padrão de regressão: 2,28%;

- Análise de regressão aceita – F de significação ($3,35 \times 10^{-7}$) é menor que o nível de significância adotado (0,05);

- Equação da reta: $y = 100,629651 - (-0,089415978)x$;

- Erro padrão para coeficiente \underline{a} (0,930334316) e \underline{b} (0,004834181);

Os coeficientes \underline{a} e \underline{b} são aceitos, pois os valores-P ($1,52 \times 10^{-12}$ e $3,35 \times 10^{-7}$, respectivamente) são menores que o nível de significância adotado (0,05). Portanto, a hipótese nula ($H_0: a = 0$ e $b = 0$) é rejeitada. Através da Estatística t, foi possível rejeitar a hipótese nula, pois o t observado para os coeficientes \underline{a} e \underline{b} (108,1651 e 18,4966, respectivamente) são maiores que o t crítico adotado (2,12 – tabela de distribuição t), aceitando os valores desses coeficientes.

c) 72 horas de incubação:

- Correlação entre as variáveis: 98,5%;

- Erro padrão de regressão: 2,76%;

- Análise de regressão aceita – F de significação ($1,07 \times 10^{-6}$) é menor que o nível de significância adotado (0,05);

- Equação da reta: $y = 101,311146 - (-0,091456996)x$;

- Erro padrão para coeficiente \underline{a} (1,127783018) e \underline{b} (0,005860159);

Os coeficientes \underline{a} e \underline{b} são aceitos, pois os valores-P ($5,58 \times 10^{-12}$ e $1,07 \times 10^{-6}$, respectivamente) são menores que o nível de significância adotado (0,05). Portanto, a hipótese nula ($H_0: a = 0$ e $b = 0$) é rejeitada. Através da Estatística t, foi possível rejeitar a hipótese nula, pois o t observado para os coeficientes \underline{a} e \underline{b} (89,83213 e 15,6066, respectivamente) são maiores que o t crítico adotado (2,12 – tabela de distribuição t), aceitando os valores desses coeficientes.

6. ÁCIDO GÁLICO

a) 24 horas de incubação:

- Correlação entre as variáveis: 95,6%;

- Erro padrão de regressão: 5,73%;

- Análise de regressão aceita – F de significação (0,002812) é menor que o nível de significância adotado (0,05);

- Equação da reta: $y = 98,33738553 - (-0,716963775)x$;

- Erro padrão para coeficiente \underline{a} (3,225169478) e \underline{b} (0,109497247);

Os coeficientes \underline{a} e \underline{b} são aceitos, pois os valores-P ($6,89 \times 10^{-6}$ e 0,002812, respectivamente) são menores que o nível de significância adotado (0,05). Portanto, a hipótese nula ($H_0: a = 0$ e $b = 0$) é rejeitada. Através da Estatística t, foi possível rejeitar a hipótese nula, pois o t observado para os coeficientes \underline{a} e \underline{b} (30,49061 e

6,54778, respectivamente) são maiores que o t crítico adotado (2,12 – tabela de distribuição t), aceitando os valores desses coeficientes.

b) 48 horas de incubação:

- Correlação entre as variáveis: 96,2%;
- Erro padrão de regressão: 6,17%;
- Análise de regressão aceita – F de significação (0,002088) é menor que o nível de significância adotado (0,05);
- Equação da reta: $y = 101,7736581 - (-0,83271634)x$;
- Erro padrão para coeficiente \underline{a} (3,458877191) e \underline{b} (0,117431822);

Os coeficientes \underline{a} e \underline{b} são aceitos, pois os valores-P ($7,94 \times 10^{-6}$ e 0,002088, respectivamente) são menores que o nível de significância adotado (0,05). Portanto, a hipótese nula ($H_0: a = 0$ e $b = 0$) é rejeitada. Através da Estatística t, foi possível rejeitar a hipótese nula, pois o t observado para os coeficientes \underline{a} e \underline{b} (29,4239 e 7,09106, respectivamente) são maiores que o t crítico adotado (2,12 – tabela de distribuição t), aceitando os valores desses coeficientes.

c) 72 horas de incubação:

- Correlação entre as variáveis: 99,7%;
- Erro padrão de regressão: 1,49%;
- Análise de regressão aceita – F de significação ($7,99 \times 10^{-6}$) é menor que o nível de significância adotado (0,05);
- Equação da reta: $y = 101,5176251 - (-0,837372011)x$;
- Erro padrão para coeficiente \underline{a} (0,839568407) e \underline{b} (0,028504061);

Os coeficientes \underline{a} e \underline{b} são aceitos, pois os valores-P ($2,81 \times 10^{-8}$ e $7,99 \times 10^{-6}$, respectivamente) são menores que o nível de significância adotado (0,05). Portanto, a hipótese nula ($H_0: a = 0$ e $b = 0$) é rejeitada. Através da Estatística t, foi possível rejeitar a hipótese nula, pois o t observado para os coeficientes \underline{a} e \underline{b} (120,9164 e 29,3773, respectivamente) são maiores que o t crítico adotado (2,12 – tabela de distribuição t), aceitando os valores desses coeficientes.

7. ÁCIDO QUÍNICO

a) 24 horas de incubação:

- Correlação entre as variáveis: 98,5%;
- Erro padrão de regressão: 1,78%;
- Análise de regressão aceita – F de significação ($1,22 \times 10^{-6}$) é menor que o nível de significância adotado (0,05);
- Equação da reta: $y = 98,34251329 - (-0,057607288)x$;
- Erro padrão para coeficiente \underline{a} (0,724193518) e \underline{b} (0,003763037);

Os coeficientes \underline{a} e \underline{b} são aceitos, pois os valores-P ($3,1 \times 10^{-13}$ e $1,22 \times 10^{-6}$, respectivamente) são menores que o nível de significância adotado (0,05). Portanto, a hipótese nula ($H_0: a = 0$ e $b = 0$) é rejeitada. Através da Estatística t, foi possível rejeitar a hipótese nula, pois o t observado para os coeficientes \underline{a} e \underline{b} (135,7959 e 15,3087, respectivamente) são maiores que o t crítico adotado (2,12 – tabela de distribuição t), aceitando os valores desses coeficientes.

b) 48 horas de incubação:

- Correlação entre as variáveis: 99,2%;
- Erro padrão de regressão: 1,35%;
- Análise de regressão aceita – F de significação ($1,76 \times 10^{-7}$) é menor que o nível de significância adotado (0,05);
- Equação da reta: $y = 97,85845701 - (-0,057851735)x$;
- Erro padrão para coeficiente \underline{a} (0,548367374) e \underline{b} (0,002849413);

Os coeficientes \underline{a} e \underline{b} são aceitos, pois os valores-P ($4,58 \times 10^{-14}$ e $1,76 \times 10^{-7}$, respectivamente) são menores que o nível de significância adotado (0,05). Portanto, a hipótese nula ($H_0: a = 0$ e $b = 0$) é rejeitada. Através da Estatística t, foi possível rejeitar a hipótese nula, pois o t observado para os coeficientes \underline{a} e \underline{b} (178,4542 e 20,303, respectivamente) são maiores que o t crítico adotado (2,12 – tabela de distribuição t), aceitando os valores desses coeficientes.

c) 72 horas de incubação:

- Correlação entre as variáveis: 97,4%;
- Erro padrão de regressão: 3,19%;
- Análise de regressão aceita – F de significação ($8,19 \times 10^{-6}$) é menor que o nível de significância adotado (0,05);
- Equação da reta: $y = 97,53144338 - (-0,07798714)x$;
- Erro padrão para coeficiente \underline{a} (1,298970293) e \underline{b} (0,006749678);

Os coeficientes \underline{a} e \underline{b} são aceitos, pois os valores-P ($1,96 \times 10^{-11}$ e $8,19 \times 10^{-6}$, respectivamente) são menores que o nível de significância adotado (0,05). Portanto, a hipótese nula ($H_0: a = 0$ e $b = 0$) é rejeitada. Através da Estatística t, foi possível rejeitar a hipótese nula, pois o t observado para os coeficientes \underline{a} e \underline{b} (75,08366 e 11,5542, respectivamente) são maiores que o t crítico adotado (2,12 – tabela de distribuição t), aceitando os valores desses coeficientes.

8. INDIRUBINA

a) 24 horas de incubação:

- Correlação entre as variáveis: 96,1%;
- Erro padrão de regressão: 3,23%;
- Análise de regressão aceita – F de significação ($3,45 \times 10^{-5}$) é menor que o nível de significância adotado (0,05);
- Equação da reta: $y = 95,73106785 - (-0,06372815)x$;
- Erro padrão para coeficiente \underline{a} (1,319311691) e \underline{b} (0,006855375);

Os coeficientes \underline{a} e \underline{b} são aceitos, pois os valores-P ($2,48 \times 10^{-11}$ e $3,45 \times 10^{-5}$, respectivamente) são menores que o nível de significância adotado (0,05). Portanto, a hipótese nula ($H_0: a = 0$ e $b = 0$) é rejeitada. Através da Estatística t, foi possível rejeitar a hipótese nula, pois o t observado para os coeficientes \underline{a} e \underline{b} (72,56137 e 9,29608, respectivamente) são maiores que o t crítico adotado (2,12 – tabela de distribuição t), aceitando os valores desses coeficientes.

b) 48 horas de incubação:

- Correlação entre as variáveis: 95,2%;
- Erro padrão de regressão: 5,33%;
- Análise de regressão aceita – F de significação ($7,45 \times 10^{-5}$) é menor que o nível de significância adotado (0,05);
- Equação da reta: $y = 95,66791317 - (-0,093074208)x$;

- Erro padrão para coeficiente \underline{a} (2,169789574) e \underline{b} (0,011274608);

Os coeficientes \underline{a} e \underline{b} são aceitos, pois os valores-P ($8,06 \times 10^{-10}$ e $7,45 \times 10^{-5}$, respectivamente) são menores que o nível de significância adotado (0,05). Portanto, a hipótese nula ($H_0: a = 0$ e $b = 0$) é rejeitada. Através da Estatística t, foi possível rejeitar a hipótese nula, pois o t observado para os coeficientes \underline{a} e \underline{b} (44,09087 e 8,25521, respectivamente) são maiores que o t crítico adotado (2,12 – tabela de distribuição t), aceitando os valores desses coeficientes.

c) 72 horas de incubação:

- Correlação entre as variáveis: 97,5%;

- Erro padrão de regressão: 4,13%;

- Análise de regressão aceita – F de significação ($6,91 \times 10^{-6}$) é menor que o nível de significância adotado (0,05);

- Equação da reta: $y = 96,83785979 - (-0,103745345)x$;

- Erro padrão para coeficiente \underline{a} (1,68395932) e \underline{b} (0,008752417);

Os coeficientes \underline{a} e \underline{b} são aceitos, pois os valores-P ($1,26 \times 10^{-10}$ e $6,91 \times 10^{-6}$, respectivamente) são menores que o nível de significância adotado (0,05). Portanto, a hipótese nula ($H_0: a = 0$ e $b = 0$) é rejeitada. Através da Estatística t, foi possível rejeitar a hipótese nula, pois o t observado para os coeficientes \underline{a} e \underline{b} (57,49115 e 11,8533, respectivamente) são maiores que o t crítico adotado (2,12 – tabela de distribuição t), aceitando os valores desses coeficientes.

ANEXO VII.

Tabelas complementares dos ensaios de citotoxicidade

Tabela I: Análise estatística das absorbâncias obtidas nas diferentes concentrações das substâncias avaliadas (24 horas de incubação). Resultados apresentados pela média \pm desvio padrão.

C ($\mu\text{g/mL}$)	Isatina	Índigo	Amentoflavona	K3,7 dira	Rutina	Ácido gálico	Ácido quínico	Indirubina
0	0,569 \pm 0,004	0,569 \pm 0,004	0,552 \pm 0,004	0,552 \pm 0,004	0,552 \pm 0,004	0,552 \pm 0,004	0,569 \pm 0,004	0,552 \pm 0,004
3,9	0,495 \pm 0,009	0,539 \pm 0,009	0,517 \pm 0,004	0,545 \pm 0,006	0,542 \pm 0,012	0,512 \pm 0,008	0,568 \pm 0,001	0,533 \pm 0,010
7,8	0,465 \pm 0,006	0,544 \pm 0,006	0,525 \pm 0,013	0,539 \pm 0,007	0,541 \pm 0,006	0,495 \pm 0,001	0,564 \pm 0,002	0,510 \pm 0,002
15,6	0,411 \pm 0,005	0,528 \pm 0,005	0,526 \pm 0,006	0,544 \pm 0,007	0,548 \pm 0,006	0,474 \pm 0,013	0,542 \pm 0,002	0,519 \pm 0,010
31,3	0,389 \pm 0,004	0,534 \pm 0,004	0,483 \pm 0,016	0,537 \pm 0,003	0,546 \pm 0,007	0,473 \pm 0,006	0,537	0,536 \pm 0,007
62,5	0,24 \pm 0,004	0,529 \pm 0,005	0,457 \pm 0,013	0,534 \pm 0,008	0,538 \pm 0,007	0,274 \pm 0,010	0,537	0,487 \pm 0,004
125	0,187 \pm 0,013	0,535 \pm 0,013	0,412 \pm 0,009	0,421 \pm 0,006	0,526	0,179 \pm 0,006	0,525 \pm 0,002	0,464 \pm 0,006
250	0,112 \pm 0,005	0,492 \pm 0,005	0,381 \pm 0,007	0,383 \pm 0,009	0,424 \pm 0,005	0,071 \pm 0,005	0,481 \pm 0,003	0,456 \pm 0,004
500	0,081 \pm 0,008	0,466 \pm 0,008	0,279 \pm 0,007	0,319 \pm 0,005	0,313 \pm 0,005	0,072 \pm 0,011	0,393 \pm 0,004	0,353 \pm 0,005
CP	0,279 \pm 0,026	0,279 \pm 0,026	0,279 \pm 0,026	0,279 \pm 0,026	0,279 \pm 0,026	0,279 \pm 0,026	0,269 \pm 0,009	0,279 \pm 0,026

Tabela II: Análise estatística das absorbâncias obtidas nas diferentes concentrações das substâncias avaliadas (48 horas de incubação). Resultados apresentados pela média \pm desvio padrão.

C ($\mu\text{g/mL}$)	Isatina	Índigo	Amentoflavona	K3,7 dira	Rutina	Ácido gálico	Ácido quínico	Indirubina
0	0,707 \pm 0,004	0,740 \pm 0,004	0,740 \pm 0,004	0,740 \pm 0,004	0,740 \pm 0,004	0,740 \pm 0,004	0,707 \pm 0,001	0,740 \pm 0,004
3,9	0,608 \pm 0,004	0,727 \pm 0,004	0,734 \pm 0,006	0,737 \pm 0,007	0,738 \pm 0,006	0,736 \pm 0,022	0,700 \pm 0,003	0,698 \pm 0,007
7,8	0,591 \pm 0,003	0,725 \pm 0,003	0,734 \pm 0,009	0,735 \pm 0,005	0,731 \pm 0,009	0,678 \pm 0,005	0,687 \pm 0,002	0,702 \pm 0,009
15,6	0,536 \pm 0,004	0,714 \pm 0,004	0,717 \pm 0,004	0,737 \pm 0,009	0,729 \pm 0,008	0,647 \pm 0,003	0,682 \pm 0,005	0,696 \pm 0,010
31,3	0,439 \pm 0,003	0,693 \pm 0,003	0,663 \pm 0,005	0,707 \pm 0,007	0,719 \pm 0,021	0,639 \pm 0,017	0,670 \pm 0,003	0,674 \pm 0,012
62,5	0,291 \pm 0,010	0,692 \pm 0,010	0,641 \pm 0,006	0,693 \pm 0,004	0,713 \pm 0,006	0,335 \pm 0,013	0,653 \pm 0,005	0,612 \pm 0,006
125	0,195 \pm 0,019	0,693 \pm 0,019	0,608 \pm 0,009	0,571 \pm 0,008	0,701 \pm 0,008	0,172 \pm 0,004	0,637 \pm 0,005	0,617 \pm 0,004
250	0,088 \pm 0,005	0,65 \pm 0,005	0,508 \pm 0,007	0,466 \pm 0,015	0,564 \pm 0,005	0,098 \pm 0,013	0,594 \pm 0,002	0,613 \pm 0,001
500	0,074 \pm 0,005	0,595 \pm 0,004	0,362 \pm 0,007	0,344 \pm 0,001	0,412 \pm 0,007	0,081 \pm 0,012	0,488 \pm 0,006	0,334 \pm 0,011
CP	0,285 \pm 0,010	0,285 \pm 0,010	0,285 \pm 0,010	0,285 \pm 0,010	0,285 \pm 0,010	0,285 \pm 0,010	0,267 \pm 0,008	0,285 \pm 0,010

Tabela III: Análise estatística das absorvâncias obtidas nas diferentes concentrações das substâncias avaliadas (72 horas de incubação). Resultados apresentados pela média \pm desvio padrão.

C ($\mu\text{g/mL}$)	Isatina	Índigo	Amentoflavona	K3,7 dira	Rutina	Ácido gálico	Ácido quínico	Indirubina
0	0,842 \pm 0,002	0,842 \pm 0,002	0,842 \pm 0,002	0,842 \pm 0,002	0,842 \pm 0,002	0,809 \pm 0,003	0,842 \pm 0,002	0,842 \pm 0,002
3,9	0,744 \pm 0,002	0,835 \pm 0,004	0,787 \pm 0,006	0,822 \pm 0,007	0,840 \pm 0,009	0,808 \pm 0,005	0,833 \pm 0,002	0,790 \pm 0,009
7,8	0,684 \pm 0,006	0,83 \pm 0,006	0,784 \pm 0,005	0,804 \pm 0,002	0,836 \pm 0,005	0,761 \pm 0,007	0,819 \pm 0,004	0,797 \pm 0,002
15,6	0,596 \pm 0,006	0,825 \pm 0,002	0,773 \pm 0,006	0,781 \pm 0,002	0,831 \pm 0,004	0,724 \pm 0,003	0,814 \pm 0,003	0,795 \pm 0,012
31,3	0,454 \pm 0,019	0,795 \pm 0,005	0,717 \pm 0,007	0,774 \pm 0,008	0,824 \pm 0,005	0,622 \pm 0,007	0,802 \pm 0,002	0,796 \pm 0,011
62,5	0,288 \pm 0,014	0,761 \pm 0,007	0,703 \pm 0,002	0,761 \pm 0,006	0,822 \pm 0,003	0,389 \pm 0,006	0,740 \pm 0,002	0,730 \pm 0,009
125	0,19 \pm 0,009	0,743 \pm 0,003	0,652 \pm 0,031	0,672 \pm 0,007	0,811 \pm 0,007	0,112 \pm 0,007	0,707 \pm 0,005	0,708 \pm 0,006
250	0,077 \pm 0,007	0,716 \pm 0,002	0,423 \pm 0,006	0,581 \pm 0,006	0,651 \pm 0,008	0,081 \pm 0,012	0,697 \pm 0,002	0,668 \pm 0,009
500	0,063 \pm 0,005	0,613 \pm 0,004	0,247 \pm 0,017	0,393 \pm 0,005	0,459	0,072 \pm 0,010	0,487 \pm 0,006	0,347 \pm 0,014
CP	0,268 \pm 0,006	0,268 \pm 0,006	0,268 \pm 0,006	0,268 \pm 0,006	0,268 \pm 0,006	0,266 \pm 0,008	0,268 \pm 0,006	0,268 \pm 0,006

ANEXO VIII. Tabelas complementares dos ensaios de atividade antimicrobiana

Tabela IV: Análise estatística das absorvâncias obtidas nas diferentes concentrações das substâncias (microdiluição – *S. aureus*). Resultados apresentados pela média \pm desvio padrão.

C ($\mu\text{g/mL}$)	Isatina	Índigo	Amentoflavona	K3,7 dira	Rutina	Ácido gálico	Ácido quínico	Indirubina
0	0,381 \pm 0,014	0,378 \pm 0,001	0,387 \pm 0,007	0,387 \pm 0,007	0,27 \pm 0,003	0,378 \pm 0,001	0,381 \pm 0,014	0,27 \pm 0,003
7,8	0,286 \pm 0,09	0,379 \pm 0,008	0,389 \pm 0,009	0,337 \pm 0,009	0,238 \pm 0,007	0,365 \pm 0,006	0,343 \pm 0,006	0,274 \pm 0,003
15,6	0,234 \pm 0,015	0,379 \pm 0,003	0,369 \pm 0,008	0,332 \pm 0,007	0,228 \pm 0,008	0,356 \pm 0,012	0,329 \pm 0,011	0,269 \pm 0,006
31,3	0,146 \pm 0,005	0,377 \pm 0,004	0,34 \pm 0,004	0,325 \pm 0,003	0,221 \pm 0,009	0,331 \pm 0,007	0,313 \pm 0,011	0,255 \pm 0,003
62,5	0,05 \pm 0,010	0,346 \pm 0,003	0,328 \pm 0,008	0,31 \pm 0,003	0,179 \pm 0,007	0,305 \pm 0,009	0,303 \pm 0,020	0,24667 \pm 0,002
125	0,045 \pm 0,012	0,335 \pm 0,003	NR	0,299 \pm 0,004	0,161 \pm 0,009	0,266 \pm 0,012	0,303 \pm 0,014	NR
250	0,045 \pm 0,005	0,311 \pm 0,010	NR	0,285 \pm 0,012	0,13 \pm 0,002	0,252 \pm 0,005	0,217 \pm 0,003	NR
500	0,036 \pm 0,006	0,256 \pm 0,006	NR	0,274 \pm 0,002	0,122 \pm 0,003	0,217 \pm 0,004	0,209 \pm 0,007	NR
1000	0,03 \pm 0,010	0,238 \pm 0,007	NR	0,232 \pm 0,002	0,092 \pm 0,012	0,123 \pm 0,008	0,051 \pm 0,007	NR
CP	0,013 \pm 0,003	0,022 \pm 0,002	0,025	0,025 \pm 0,002	0,025	0,024 \pm 0,004	0,013 \pm 0,003	0,024 \pm 0,004

Tabela V: Análise estatística das absorbâncias obtidas nas diferentes concentrações das substâncias (microdiluição – *E. coli*). Resultados apresentados pela média \pm desvio padrão.

C ($\mu\text{g/mL}$)	Isatina	Índigo	Amentoflavona	K3,7 díra	Rutina	Ácido gálico	Ácido quínico	Indirubina
0	0,488 \pm 0,011	0,541 \pm 0,010	0,543 \pm 0,004	0,543 \pm 0,004	0,399 \pm 0,004	0,541 \pm 0,010	0,488 \pm 0,001	0,399 \pm 0,004
7,8	0,377 \pm 0,005	0,547 \pm 0,003	0,545 \pm 0,006	0,544 \pm 0,001	0,391 \pm 0,008	0,546 \pm 0,004	0,496 \pm 0,010	0,393 \pm 0,008
15,6	0,341 \pm 0,009	0,545 \pm 0,003	0,531 \pm 0,009	0,536 \pm 0,006	0,382 \pm 0,007	0,546 \pm 0,003	0,492 \pm 0,005	0,373 \pm 0,007
31,3	0,329 \pm 0,004	0,533 \pm 0,005	0,497 \pm 0,002	0,526 \pm 0,005	0,358 \pm 0,002	0,478 \pm 0,009	0,415 \pm 0,009	0,366 \pm 0,006
62,5	0,122 \pm 0,005	0,437 \pm 0,015	0,489 \pm 0,004	0,522 \pm 0,007	0,355 \pm 0,005	0,458 \pm 0,009	0,378 \pm 0,002	0,359
125	0,026 \pm 0,004	0,366 \pm 0,003	NR	0,519 \pm 0,003	0,322 \pm 0,005	0,422 \pm 0,006	0,364 \pm 0,009	NR
250	0,015 \pm 0,003	0,367 \pm 0,006	NR	0,453 \pm 0,009	0,303 \pm 0,008	0,385 \pm 0,004	0,26 \pm 0,009	NR
500	0,011 \pm 0,002	0,365 \pm 0,005	NR	0,347 \pm 0,011	0,243 \pm 0,007	0,365 \pm 0,009	0,238	NR
1000	0,005 \pm 0,001	0,258 \pm 0,006	NR	0,289 \pm 0,008	0,185 \pm 0,007	0,347 \pm 0,004	0,119 \pm 0,001	NR
CP	0,027 \pm 0,002	0,024 \pm 0,004	0,019 \pm 0,006	0,024 \pm 0,005	0,02 \pm 0,004	0,024 \pm 0,004	0,027	0,02

ANEXO IX.

Interpretação da regressão linear e ANOVA para os ensaios de atividade anti-*Leishmania*

1. ISATINA

- Correlação entre as variáveis: 96,4%;
- Erro padrão de regressão: 6,32%;
- Análise de regressão aceita – F de significação (0,000485319) é menor que o nível de significância adotado (0,05);
- Equação da reta: $y = 101,2763722 - (-0,624517892)x$;
- Erro padrão para coeficiente \underline{a} (3,541783831) e \underline{b} (0,060132327);

Os coeficientes \underline{a} e \underline{b} são aceitos, pois os valores-P ($8,90 \times 10^{-6}$ e 0,000485319, respectivamente) são menores que o nível de significância adotado (0,05). Portanto, a hipótese nula ($H_0: a = 0$ e $b = 0$) é rejeitada. Através da Estatística t, foi possível rejeitar a hipótese nula, pois o t observado para os coeficientes \underline{a} e \underline{b} (28,59473561 e 10,3857264, respectivamente) são maiores que o t crítico adotado (2,12 – tabela de distribuição t), aceitando os valores desses coeficientes.

2. ÁCIDO GÁLICO

- Correlação entre as variáveis: 87,9%;
- Erro padrão de regressão: 8,57%;
- Análise de regressão aceita – F de significação (0,000573619) é menor que o nível de significância adotado (0,05);
- Equação da reta: $y = 90,09354795 - (-0,123612562)x$;
- Erro padrão para coeficiente \underline{a} (3,813038679) e \underline{b} (0,018680493);

Os coeficientes \underline{a} e \underline{b} são aceitos, pois os valores-P ($3,8 \times 10^{-7}$ e 0,000573619, respectivamente) são menores que o nível de significância adotado (0,05). Portanto, a hipótese nula ($H_0: a = 0$ e $b = 0$) é rejeitada. Através da Estatística t, foi possível rejeitar a hipótese nula, pois o t observado para os coeficientes \underline{a} e \underline{b} (23,6277747 e 6,617200048, respectivamente) são maiores que o t crítico adotado (2,12 – tabela de distribuição t), aceitando os valores desses coeficientes.

ANEXO X.

Tabelas complementares dos ensaios de atividade anti-*Leishmania*

Tabela VI: Análise estatística das absorvâncias (abs) e do crescimento parasitário (%) nas diferentes concentrações das substâncias (técnica de MTT). Resultados apresentados pela média \pm desvio padrão.

C ($\mu\text{g/mL}$)	Isatina (abs)	Isatina (%)	Ácido gálico (abs)	Ácido gálico (%)
0	0,994 \pm 0,004	100,0 \pm 0,44	994 \pm 0,004	100,0 \pm 0,44
7,8	0,949 \pm 0,005	95,5 \pm 0,52	0,984 \pm 0,015	98,9 \pm 1,51
15,6	0,944 \pm 0,005	94,9 \pm 0,53	0,889 \pm 0,008	89,4 \pm 0,81
31,3	0,869 \pm 0,009	87,4 \pm 0,87	0,809 \pm 0,007	81,4 \pm 0,69
62,5	0,517 \pm 0,006	52,0 \pm 0,56	0,747 \pm 0,010	75,1 \pm 0,96
125	0,264 \pm 0,011	26,5 \pm 1,14	0,660 \pm 0,004	66,4 \pm 0,40
250	0,154 \pm 0,011	15,5 \pm 1,20	0,514 \pm 0,006	51,6 \pm 0,67
500	0,111 \pm 0,008	11,2 \pm 0,84	0,348 \pm 0,006	35,1 \pm 0,64
CP	0,497 \pm 0,006	50,0 \pm 0,62	0,497 \pm 0,006	50,0 \pm 0,62