

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CAMPUS DE ARARAQUARA

**Atividade mutagênica e ativadora da resposta
imune celular induzidas por *Byrsonima crassa*
Niedenzu e *Byrsonima intermedia* A.Juss.
(Malpighiaceae)**

CÁSSIA REGINA PRIMILA CARDOSO

Dissertação para a obtenção do título de MESTRE em Análises Clínicas

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

ARARAQUARA – SP

2006

Ficha Catalográfica

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

C268a Cardoso, Cássia Regina Primila
Atividade mutagênica e ativadora da resposta imune celular induzidas por *Byrsonima crassa* Niedenzu e *Byrsonima intermédia* A. Juss (Malpighiaceae) / Cássia Regina Primila Cardoso . – Araraquara, 2006. 110 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Análises Clínicas

Orientador: Eliana Aparecida Varanda

1.Byrsonima. 2.Teste de Ames. 3.Óxido nítrico. I. Varanda, Eliana Aparecida, orient. II. Título.

CDD: 615.37028

CAPES:40300005

TERMO DE APROVAÇÃO

NOME DA CANDIDATA: Cássia Regina Primila Cardoso

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE: Atividade mutagênica e ativadora da resposta imune celular induzidas por *Byrsonima crassa* Niedenzu e *Byrsonima intermedia* A.Juss. (Malpighiaceae)

A Comissão examinadora do trabalho de Defesa de Mestrado, em sessão pública realizada a 21/02/2006, considerou a candidata

APROVADA

REPROVADA

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

INSTITUIÇÃO: Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP – Araraquara, SP.

SEGUNDO EXAMINADOR: Prof^a.Dr^a.Beatriz Maria Machado de Medeiros

INSTITUIÇÃO: Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP – Araraquara, SP.

TERCEIRO EXAMINADOR: Prof^a.Dr^a. Denise Crispim Tavares

INSTITUIÇÃO: Universidade de Franca, UNIFRAN – Franca, SP.

ARARAQUARA, 21 de fevereiro de 2006

DADOS CURRICULARES

DADOS PESSOAIS

NOME Cássia Regina Primila Cardoso

NASCIMENTO 21/07/1976

NATURALIDADE Osasco – SP

NACIONALIDADE brasileira

ESTADO CIVIL solteira

FILIAÇÃO:

PAI Júlio Junes Cardoso

MÃE Maria Aparecida Primila Cardoso

DOCUMENTO DE IDENTIDADE 26441380-5

CADASTRO DE PESSOA FÍSICA 27895371860

ENDEREÇO RESIDENCIAL Rua Agostinho

Sonego, 409

Campus Ville – CEP: 14810-737

Araraquara – São Paulo

FORMAÇÃO ACADÊMICA

BACHAREL EM FARMÁCIA, CURSO DE FARMÁCIA-BIOQUÍMICA CONCLUÍDO EM 1999 NA FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DO CAMPUS DE ARARAQUARA DA UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA.

MESTRE EM ANÁLISES CLÍNICAS DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ANÁLISES CLÍNICAS, CONCLUÍDO EM 21 DE FEVEREIRO DE 2006 NA FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DO CAMPUS DE ARARAQUARA DA UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA.

ESTÁGIOS

- Estágio de Docência na Disciplina de Farmacognosia do Departamento de Princípios Naturais e Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP/Araraquara. Orientadora: Prof^ª.Dr^ª. Raquel Regina Duarte Moreira
- Estágio de Treinamento no Laboratório Didático de Informática da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP/Araraquara. Coordenador: Engenheiro Márcio Pereira de Toledo
Bolsista PAE
- Estágio de Treinamento no Laboratório de Citologia Clínica do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP/Araraquara. Orientadora: Prof^ª.Dr^ª. Cristiane Pienna Soares
Bolsista PAE
- Estágio de Treinamento no Laboratório de Imunologia Clínica do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP/Araraquara. Orientadora: Prof^ª.Dr^ª. Iracilda Zeppone Carlos
Bolsista PAE
- Estágio de Treinamento no Laboratório de Parasitologia Clínica do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP/Araraquara. Orientador: Prof.Dr. João Flávio Giuzzi

TRABALHOS CIENTÍFICOS

TRABALHOS APRESENTADOS

WORKSHOPS

- CARDOSO, C.R.P.; CARLOS, I.Z.; SANNOMIYA, M.; VILEGAS, W.; VARANDA, E.A.; Atividade mutagênica e ativação da resposta imune induzidas por extratos de *Byrsonima crassa* e *Byrsonima intermedia*. VI Workshop de Plantas Medicinais da UNESP/Botucatu, Botucatu – SP, 2004.
- CARDOSO, C.R.P.; Controle de qualidade microbiológico de drogas vegetais. VII Encontro Regional de Biomedicina do IB da UNESP/Botucatu, Botucatu – SP, 2004.
- CARDOSO, C.R.P.; SANNOMIYA, M.; VILEGAS, W.; VARANDA, E.A.; Atividade mutagênica induzida por extratos de *Byrsonima crassa* e *Byrsonima intermedia*. Workshop de Plantas Medicinais da UNESP/Botucatu, Botucatu – SP, 2004.

SIMPÓSIOS

- CARDOSO, C.R.P.; SANNOMIYA, M.; VILEGAS, W.; VARANDA, E.A.; Atividade mutagênica induzida por extratos de *Byrsonima fagifolia*. I Simpósio do Biota/Fapesp, Águas de Lindóia - SP, 2005.
- CARDOSO, C.R.P.; SANNOMIYA, M.; VILEGAS, W.; VARANDA, E.A.; Atividade mutagênica induzida por extratos de *Byrsonima fagifolia*. I Simpósio de Plantas Medicinais da UNICAMP – Campinas - SP, 2005.
- CARDOSO, C.R.P.; SANNOMIYA, M.; VILEGAS, W.; VARANDA, E.A.; Atividade mutagênica induzida por extratos de *Byrsonima crassa* e *Byrsonima intermedia*. I Simpósio de Plantas Medicinais da UNICAMP – Campinas - SP, 2005.

CONGRESSOS

- CARDOSO, C.R.P.; SANNOMIYA, M.; VILEGAS, W.; VARANDA, E.A.; Atividade mutagênica induzida por extratos de *Byrsonima crassa*, *Byrsonima*

intermedia e frações do extrato metanólico de *Byrsonima intermedia*. 51º Congresso Brasileiro de Genética – Águas de Lindóia – SP, 2005.

- CARDOSO, C.R.P.; SANNOMIYA, M.; VILEGAS, W.; VARANDA, E.A.; Atividade mutagênica e ativação da resposta imune induzidas por extratos de *Byrsonima crassa*, *Byrsonima intermedia*. VII Congresso Brasileiro de Mutagênese, Carcinogênese e Teratogênese Ambiental - Natal – RN, 2005.

TRABALHOS PUBLICADOS

- CARDOSO, C.R.P.; NOGUEIRA, M.E.I.; BISO, F.I.; LONGO, M.C.; dos SANTOS, L.C.; VARANDA, E.A.; Investigation of genotoxic and antigenotoxic activities of *Melampodium divaricatum* in *Salmonella typhimurium*. **Toxicology in vitro**, article in press, 2005.

TRABALHOS SUBMETIDOS À PUBLICAÇÃO

- CARDOSO, C.R.P.; VARANDA, E.A.; CÓLUS, I.M.S.; BENARDI, C.C.; SANNOMIYA, M.; VILEGAS, W.; Genotoxic activity promoted by amentoflavone and methanolic extract of *Byrsonima crassa* Niedenzu. **Submetido à Revista Toxicology**, 27/01/2006, Ms. N°.: TOX-06-48.

Esse trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Mutagênese do Departamento de Ciências Biológicas e no Laboratório de Imunologia Clínica do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista (UNESP)

- Campus de Araraquara.

Aos meus pais, Júlio e Maria Aparecida,
Que apesar de tantas dificuldades, sempre me apoiaram e
incentivaram, me fazendo acreditar que essa conquista, até
então um sonho aparentemente inatingível poderia ser
possível... E esse sonho tão nosso, hoje se tornou uma
realidade de valor inestimável...

A minha irmã Ana Paula,
Amiga verdadeira e grande companheira, em todos os
momentos...
Aos meus sobrinhos Raphael e Phillipe,
Doces presenças infantis, que tanta alegria trazem a minha
existência...
MINHA FAMÍLIA, MINHA VIDA...
MUITO OBRIGADA POR ESTAREM SEMPRE COMIGO!

À minha orientadora

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

Uma mulher admirável...

Por ter acreditado em meu desempenho e ter me incentivado

na busca do constante aperfeiçoamento...

À Prof^a.Dr^a. Iracilda Zeppone Carlos

Pela importante colaboração e disponibilidade de conhecimentos,
fundamentais para a realização desse trabalho...

Agradecimento a DEUS

Senhor... Nesse momento, quero apenas agradecer...

Pois em muitos momentos apenas pedi...

Pedi **paz** ao coração... Deu-me paciência para alcançá-la.

Pedi **força** ao meu corpo cansado... Deu-me disposição para superar-me.

Pedi **riqueza**... Deu-me sabedoria, para reconhecê-la nas coisas simples.

Pedi **poder**... Deu-me perseverança na busca de meus objetivos.

Pedi **luz**... Deu-me visão espiritual para não me perder no caminho da vida.

Pedi **alegria**... Deu-me compreensão das dificuldades, para não cair no abatimento.

Senhor... Nesse momento, quero apenas agradecer...

Por que me ensinaste que a verdadeira **fé** pode fazer brotar, mesmo do pó, a mais bela flor...

Sabes que sou pequena, mas a Ti me entrego... Faze em mim a Tua vontade, e que eu a compreenda, aceite e realize com devoção...

Cássia Regina Primila Cardoso

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Dr^a. Beatriz Maria Machado de Medeiros, pelo valioso incentivo desde o tempo em que participar desse trabalho era ainda um sonho.

À Prof^a.Dr^a. Raquel Regina Duarte Moreira, pela amizade desde a época de graduação e hoje, nesse trabalho, me ajudando na "arte de trabalhar com as plantas".

À Prof^a.Dr^a. Ilce Mara Cólus, pela amizade e valiosa contribuição.

Ao Prof.Dr. Wagner Vilegas e à Prof^a.Dr^a. Lourdes Campaner dos Santos, por disporem cordialmente todo o conhecimento em prol da realização desse trabalho.

À Dr^a. Miriam Sannomiya, pelo valioso trabalho conjunto e suporte quanto ao conhecimento químico das espécies de *Byrsonima*.

Ao Prof. Dr. Luis Victor do Sacramento (Botânica) e Prof^a. Dr^a. Rosângela Gonçalves Machado (Toxicologia), pela amizade, apoio e sugestões.

À Prof^a. Dr^a. Thais Maria Bauab e à Prof^a. Dr^a. Clarice Queico Fujimura Leite, pela amizade e colaboração durante toda a realização desse trabalho.

A todos os professores do Departamento de Ciências Biológicas, Departamento de Princípios Naturais e Toxicologia e Departamento de Análises Clínicas dessa unidade que, de inúmeras formas e em muitas situações, contribuíram de maneira valiosa para o meu aperfeiçoamento durante esse trabalho.

À Prof^a.Dr^a. Maria Stella Gonçalves Raddi e aos pós-graduandos Verônica e Rodrigo, pela realização dos experimentos que complementaram e enriqueceram o conteúdo desse trabalho.

À Marisa Campos Polesi Placeres, pela amizade e extrema disponibilidade, paciência e contribuição na realização dos experimentos imunológicos.

À Edinéia, Marisa e Silvia, pela amizade e auxílio no desenvolvimento de metodologias e preparo de materiais no Laboratório de Mutagênese.

Aos meus amigos (e companheiros de jornada!) do Laboratório de Mutagênese: Ana Paula, Fabiana, Maira, Mariana, Flávio, Walclécio e, com especial carinho, ao Fábio e à Soraya, que acompanharam minhas atividades com precioso apoio e são um exemplo a ser seguido na "vida acadêmica".

Ao Luis Eduardo dos Santos, pela amizade e auxílio no estágio de docência realizado no Laboratório de Farmacognosia, período esse que me trouxe muitos conhecimentos.

Aos funcionários da biblioteca: Moacir, Irani, Ana Cristina, Maximiliano, Laura, Ana Lúcia, Sônia, Keila, Natalina... Pela amizade e por tornarem nosso trabalho de pesquisa uma prática agradável e muito satisfatória.

À Aparecida Bernadete Jesus (Berna), pela constante disponibilidade e apoio.

Às funcionárias da seção de pós-graduação, Cláudia, Sônia, Laura... Pelo apoio sempre carinhoso, inestimável orientação e por sempre serem "as flores do meu buquê"...

A todos os professores do curso de graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP, por terem contribuído para minha formação como profissional e como ser humano.

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

Aos colegas de graduação da 67ª Turma, pela amizade... Embora cada um de nós tenha seguido o seu caminho, os momentos bons estarão sempre em minha lembrança.

Ao Programa Biota - Fapesp, pela iniciativa de promover um trabalho integrado em prol da utilização sustentável da Biodiversidade.

À minha querida e verdadeira amiga, Mariana Carina Frigieri, pela serenidade e companheirismo com que dividiu comigo os momentos alegres e os difíceis, quando moramos juntas, e por ter sido a maior incentivadora na busca desse sonho.

A todos os meus amigos, dentro e fora da Universidade, que sempre estiveram comigo, nos momentos bons ou nas dificuldades, com inestimável apoio.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente me auxiliaram na realização desse trabalho e de um grande sonho...

Obrigada!!!

"De uma simples folha faço um chá"... Deste, um remédio...
Do remédio, obtenho uma cura...

Quantos milagres estão guardados na Natureza!"

Jacob Melo

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	IV
LISTA DE FIGURAS.....	V
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	VII
RESUMO	
ABSTRACT	
I. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Aspectos gerais sobre o uso de Plantas Medicinais.....	2
1.2. Flora do Cerrado Brasileiro.....	4
1.2.1. <i>Byrsonima crassa</i> Niedenzu.....	6
1.2.2. <i>Byrsonima intermedia</i> A. Juss.....	6
1.3. Mutagenicidade.....	9
1.4. Resposta imunológica.....	10
II. OBJETIVOS.....	16
III. MATERIAL E MÉTODOS.....	17
3.1. Obtenção do material vegetal.....	17
3.2. Obtenção dos extratos, frações e compostos isolados de <i>B. crassa</i> Niedenzu e <i>B. intermedia</i> A.Juss.....	17
3.2.1. Obtenção dos extratos de <i>B. crassa</i> Niedenzu e <i>B. intermedia</i> A.Juss.....	17
3.2.2. Obtenção das frações do extrato metanólico de <i>B. crassa</i> Niedenzu.....	18
3.2.3. Obtenção dos compostos isolados a partir da fração acetato de etila do extrato metanólico de <i>B. crassa</i> Niedenzu.....	19
3.3. Teste de Ames.....	23

3.3.1. Extratos, frações e compostos isolados.....	23
3.3.2. Linhagens de <i>Salmonella typhimurium</i>	23
3.3.3. Manutenção e estoque das cepas, verificação das características genéticas.....	24
3.3.4. Preparo dos inóculos de <i>Salmonella typhimurium</i>	24
3.3.5. Meios de cultura.....	24
3.3.6. Preparo da mistura S9.....	25
3.3.7. Controles.....	25
3.3.8. Ensaio de mutagenicidade.....	25
3.4. Ensaio imunológico.....	27
3.4.1. Animais.....	27
3.4.2. Obtenção de células peritoneais (PEC).....	27
3.4.3. Ensaio de citotoxicidade.....	29
3.4.4. Determinação da liberação de Óxido Nítrico.....	29
3.4.5. Determinação da liberação do Fator de Necrose Tumoral-alfa.....	32
3.4.5.1. Obtenção do sobrenadante.....	32
3.4.5.2. Bioensaio para TNF- α	32
3.5. Análise estatística.....	35
3.5.1. Teste de Ames.....	35
3.5.2. Ensaio imunológico.....	35
IV. RESULTADOS.....	36
4.1. Teste de Ames com extratos, frações e compostos isolados de <i>B. crassa</i> Niedenzu.....	36
4.2. Teste de Ames com extratos de <i>B.intermedia</i> A.Juss.....	37

4.3. Ensaio de citotoxicidade.....	43
4.4. Ensaio de liberação de Óxido Nítrico com extratos e as frações de <i>B. crassa</i> Niedenzu.....	43
4.5. Ensaio de Liberação de Óxido Nítrico com extratos de <i>B. intermedia</i> A.Juss.....	43
4.6. Ensaio de Liberação de TNF- α com extratos e frações de <i>B. crassa</i> Niedenzu.....	46
4.7. Ensaio de Liberação de TNF- α com extratos de <i>B.intermedia</i> A.Juss.....	46
V. DISCUSSÃO.....	48
VI. CONCLUSÕES.....	65
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	66
VII. APÊNDICE.....	85

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** Atividade mutagênica expressa pela média \pm desvio padrão do número de revertentes/placa nas linhagens bacterianas TA98, TA100, TA97a e TA102 expostas aos extratos de *Byrsonima crassa*, em várias concentrações, com metabolização (+S9) ou sem metabolização (-S9).....39
- Tabela 2.** Atividade mutagênica expressa pela média \pm desvio padrão do número de revertentes/placa nas linhagens bacterianas TA98, TA100, TA97a e TA102 expostas às frações aquosa e acetato de etila de *Byrsonima crassa*, em várias concentrações, com metabolização (+S9) ou sem metabolização (-S9).....40
- Tabela 3.** Atividade mutagênica expressa pela média \pm desvio padrão do número de revertentes/placa na linhagem bacteriana TA98 exposta aos compostos isolados da fração acetato do extrato metanólico de *Byrsonima crassa*, em várias concentrações, com metabolização (+S9) e sem metabolização (-S9).....41
- Tabela 4.** Atividade mutagênica dos extratos de *Byrsonima intermedia* A.Juss. em linhagens de *S. typhimurium*, em presença (+S9) e ausência (-S9) de ativação metabólica.....42

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. <i>Byrsonima crassa</i> Niedenzu.....	8
Figura 2. <i>Byrsonima intermedia</i> A.Juss.....	8
Figura 3. Óxido nítrico sintetase (isoformas) – (DUSSE, 2003).....	12
Figura 4. Reação bioquímica da síntese de NO (Adaptado de MacMiccking et al., 1997).....	13
Figura 5. Fluxograma para a obtenção dos extratos de <i>B.crassa</i> (Bc) e <i>B.intermedia</i> (Bi).....	21
Figura 6. Representação esquemática para a obtenção das frações e compostos isolados do extrato metanólico das folhas de <i>Byrsonima crassa</i> Niedenzu.....	22
Figura 7. Teste de Ames (esquema) – A) sem ativação metabólica; B) com ativação metabólica.....	26
Figura 8. Esquema de obtenção das células de exudato peritoneal de camundongos Swiss para os ensaios imunológicos.....	28
Figura 9. Esquema do ensaio de liberação de NO por macrófagos peritoneais de camundongos Swiss.....	31
Figura 10. Esquema de obtenção dos sobrenadantes das culturas de PEC em presença de extratos e frações de <i>B.crassa</i> e <i>B.intermedia</i>	33
Figura 11. Esquema do ensaio de liberação de TNF- α por macrófagos peritoneais de camundongos Swiss.....	34
Figura 12. Produção de óxido nítrico (NO) em cultura de macrófagos peritoneais de camundongos na presença dos extratos e frações de <i>B.crassa</i> Niedenzu e <i>B.intermedia</i> A.Juss.....	45

Figura 13. Produção de TNF- α em cultura de macrófagos peritoneais de camundongos na presença de extratos e frações de *B.crassa* Niedenzu e *B.intermedia* A.Juss.....47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AcEt: acetato de etila

°C: graus Celsius

μmols: micromols

μg: micrograma

μL: microlitro

μM: micromolar

AcOEt: acetato de etila

AIDS: síndrome da imunodeficiência adquirida

ANOVA: análise de variância

Bi: *Byrsonima intermedia* A.Juss.

Bc: *Byrsonima crassa* Niedenzu (IK)

bio: biotina

cm: centímetro

CC: cromatografia em coluna

CCD: cromatografia em camada delgada

cNOS: óxido nítrico sintetase constitutiva

CO₂: dióxido de carbono

DMSO: dimetilsulfóxido

DNA: ácido desoxirribonucléico

ECHCl₃: extrato clorofórmico

EMeOH: extrato metanólico

EMeOH 80%: extrato metanol/água 80:20

ELISA: Enzyme linked immunosorbent assay

eNOS: óxido nítrico sintetase endotelial

FAPESP: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

Fr.: fração

g: grama

G-6-P: glicose-6-fosfato

h: horas

H₂O: água

H₂O₂: água oxigenada

his: histidina

HPLC: cromatografia líquida de alta eficiência

IFN- γ : interferon-gama

IL-1: interleucina-1

iNOS: óxido nítrico sintetase induzível

IQ/UNESP: Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

K: potássio

kg: kilograma

LPS: lipopolissacarídeo

M: molar

mg: miligrama

Mg: magnésio

MeOH: metanol

MS: espectrometria de massas

NADH: nicotinamida adenina dinucleotídeo

NADP: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

NADPH: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida

NaNO₂: nitrito de sódio

ng: nanogramas

NHA: N^G-hidroxi-L-arginina

nm: nanômetro

nmols: nanomols

nNOS: óxido nítrico sintetase neuronal

NO: óxido nítrico

NO₂⁻: nitrito

NOS: óxido nítrico sintetase

NPD: 4-nitrofenilendiamina

NP/PEG: *Natural product/polyethylenoglicol*

PBS: solução salina tamponada com fosfato

PEC: células de exudato peritoneal

pg: picogramas

RM: razão de mutagenicidade

RMN: ressonância magnética nuclear

RNA: ácido ribonucléico

rpm: rotações por minuto

RPMI-1640: *Roswell Park Memorial Institute* (meio de cultura – série 1640)

RPMI-1640-C: *Roswell Park Memorial Institute* (meio de cultura – série 1640) completo

TA: Teste de Ames

TNF- α : Fator de necrose tumoral – alfa

U: unidades

UNESP: Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

UV: ultra-violeta

VN: solução de vermelho neutro

v/v: volume por volume

RESUMO

Considerando a pesquisa de novas moléculas farmacologicamente ativas, orientada pelo uso tradicional das plantas com finalidade terapêutica, o presente trabalho avaliou os efeitos genotóxicos e de ativação do sistema imunológico em duas espécies de plantas do gênero *Byrsonima*: *Byrsonima crassa* e *Byrsonima intermedia*. Essas espécies são plantas de uso popular, pertencentes à flora do Cerrado Brasileiro, utilizadas pela população para disfunções gástricas e diarreias. Foram realizados ensaios para a caracterização da mutagenicidade dos extratos, através do Teste de Ames (TA), utilizando-se linhagens geneticamente modificadas de *Salmonella typhimurium* e de ativação da resposta imune celular, utilizando-se cultura de macrófagos de exsudato peritoneal (PEC) de camundongos Swiss, avaliando a liberação celular de Fator de Necrose Tumoral-alfa (TNF- α) e Óxido nítrico (NO), importantes moduladores da resposta inflamatória. Foi verificado que somente o extrato metanólico de *B. crassa* apresentou atividade mutagênica positiva na linhagem TA98, com e sem ativação metabólica. Analisando-se as frações aquosa e acetato de etila, verificou-se que o composto provavelmente responsável pela atividade mutagênica do extrato metanólico está presente na fração acetato. Testes realizados com os compostos isolados dessa fração (catequina, galato de metila, quercetina -3-O- β -D-galactopiranosídeo, quercetina-3-O- α -arabinopiranosídeo e amentoflavona) revelaram ação mutagênica da amentoflavona e indícios de mutagenicidade da quercetina arabinopiranosídeo. Nos ensaios imunológicos, verificou-se que os extratos de *B. crassa* e *B. intermedia* promoveram estímulo da liberação de NO por macrófagos de camundongos em níveis reduzidos, assim como a fração aquosa do extrato metanólico de *B. crassa*. A fração acetato de etila do extrato metanólico de *B. crassa* apresentou atividade estimuladora significativa para a liberação de NO e

TNF- α . Esses resultados indicam que os compostos presentes nessa fração são capazes de estimular a atividade celular em geral, além de interferir em sua constituição genética, de acordo com os resultados obtidos nos ensaios de mutagenicidade.

■ **PALAVRAS-CHAVE:** *Byrsonima crassa*; *Byrsonima intermedia*; extrato metanólico; fração acetato de etila; galato de metila; quercetina; óxido nítrico; fator de necrose tumoral- α ; mutagenicidade; teste de Ames.

ABSTRACT

Considering the research of active new molecules, leaded by the traditional use of plants with therapeutic proposal, this paper tested the genotoxic effects and the activation of the immune system in two species of *Byrsonima*: *Byrsonima crassa* and *Byrsonima intermedia*. These are popular use species that belong to the Brazilian Cerrado, utilized by population to gastric dysfunctions and diarrheas. Many assays were done to give the characterization of mutagenicity of the extracts, through the Ames test (TA) using a line of genetic changed *Salmonella typhimurium* and the activation of the cellular response, using a culture of peritoneal macrophages from Swiss mice, to test the cell liberation of the Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α) and Nitric Oxide (NO), important modulators on the inflammation response. It was verified that only the methanolic extract of *B.crassa* presented positive mutagenic activity in the line TA98, with and without metabolic activation. Analyzing the watering and ethyl acetate portions, it was checked that the substance that probably is responsible by the mutagenic activity of the methanolic extract is present on the ethyl acetate portion. Assays achieved with isolated compounds from this portion - (+)-catechin, methyl galate, quercetin-3-*O*- β -D-galactopyranoside, quercetin-3-*O*- α -L-arabinopyranoside and amentoflavone – discovered mutagenic activity of amentoflavone and mutagenicity signals of quercetin-3-*O*- α -L-arabinopyranoside. On this immunologic assays, it was observed that the *B.crassa* and *B.intermedia* extracts did not promote the stimulation of leaving NO and TNF- α by macrophages of mouse, just live the watering portion from *B.crassa* methanolic extract. The ethyl acetate *B.crassa* portion presented stimulated and relevant activity to the liberation of NO and TNF- α . These results indeed that the substances present in this portion

are able to stimulate the cell activity in general, and moreover interfere on its genetic constitution, according to the results obtained on the mutagenic assays.

■ **KEYWORDS:** *Byrsonima crassa*; *Byrsonima intermedia*; methanolic extract; ethyl acetate portion; methyl galate; quercetin; nitric oxide; tumor necrosis factor-alpha; mutagenicity; Ames test.

I. INTRODUÇÃO

1.1. Aspectos gerais sobre o uso de plantas medicinais

As plantas são mundialmente empregadas na medicina popular e apesar do uso indiscriminado das mesmas, até hoje são escassos os estudos sobre as suas constituições químicas e atividades biológicas. A literatura descreve inúmeras atividades biológicas relacionadas com os compostos encontrados nessas preparações tradicionais, principalmente os fenólicos (MONTOURO et al., 2005). Há muitos anos, as plantas são de grande importância no tratamento de algumas doenças e, dessa forma, o estudo da constituição química tem contribuído para que alguns fármacos potentes tenham sido descobertos (SANNOMIYA et al., 2004). Ervas medicinais são empregadas na fabricação de medicamentos e na medicina tradicional ao longo de gerações (LOPES et al., 2000). Extratos vegetais e seus constituintes isolados podem ser usados na fabricação de produtos terapêuticos industrializados, com vários objetivos (MARQUES, 2002). Relatos revelam que cerca de 80% da população mundial utiliza plantas com finalidade terapêutica (FETROW & AVILA, 2000).

A indústria de produtos fitoterápicos tem apresentado, em geral, um crescimento anual de 25% em seus lucros (FETROW & AVILA, 2000). Além disso, o desenvolvimento de um fitoterápico pode ser obtido com custos menores que um fármaco sintético (YUNES et al., 2001). Em muitos países com cultura diversificada, o uso de plantas medicinais tem crescido na última década, generalizando-se em todos os quadrantes do mundo. Nos EUA, por exemplo, aproximadamente 25% das prescrições contêm compostos originados de plantas (YAMADA, 1998). Em Cuba, a rica flora do país permite vasta tradição no uso de fitoterápicos (VIZOSO et al., 2002). Já na África do Sul, o

uso comum e medicinal de plantas é vasto, com grande produção e obtenção de extratos, movimentando setores da economia (VERSCHAEVE et al., 2004). Na Alemanha, vários fitoterápicos já foram liberados no mercado e 70% dos profissionais de saúde prescrevem esses produtos aos pacientes, mantendo um dos maiores mercados mundiais de drogas de origem vegetal (FETROW & AVILA, 2000). No Brasil, muitas plantas 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).

Em grande parte, os efeitos gerados pelos constituintes de uma planta no organismo vivo são verificados baseando-se nos conhecimentos populares de uso repetitivo e tradicional. Sabe-se que os vegetais e frutas possuem classes de agentes fitoquímicos com diversas ações terapêuticas, como efeitos antioxidantes, antimutagênicos e até anticarcinogênicos (KUSAMRAN et al., 1998; NAKAMURA et al., 1998). Existem muitos estudos que enfatizam a atividade antimutagênica de plantas (NOGUEIRA et al., 2005). Também existem diversos estudos relacionados com a ação benéfica de plantas na modulação da resposta imunológica (LOPES et al., 2004). Pae et al. (2003), por exemplo, estudaram extratos de *Catalpa ovata* G. Don., tradicional planta ornamental da Coreia e verificaram importante ação inibitória da liberação de óxido nítrico e fator de necrose tumoral- α por macrófagos, o que caracteriza sua ação antiinflamatória. Enfim, os extratos de muitas plantas podem ser usados no tratamento de várias doenças humanas (YEN et al., 2001).

Apesar de muitas ações benéficas das plantas, é importante verificar que alguns de seus constituintes podem ser tóxicos ao organismo, e o metabolismo vegetal também pode gerar

metabólitos com esta mesma atividade. Segundo AMES (1983), elementos presentes em vegetais da dieta humana, além de outros tipos como medicinais, apresentam substâncias nocivas para o organismo.

De acordo com estudos de Marques et al. (2003), o extrato hidroalcoólico de *Ocotea duckei*, rico em alcalóides, mostrou-se indutor de mutagenicidade. Varanda et al. (2002), verificaram que extratos de *Brosimum gaudichaudii* apresentaram efeitos genotóxicos, através de teste de Ames e culturas de células CHO. Ferreira & Vargas (1999) verificaram que os extratos de algumas plantas usadas na medicina popular do sul do Brasil apresentaram atividade mutagênica. Nesses extratos foram encontrados flavonóides, taninos e antraquinonas.

Ensaio de genotoxicidade de curta duração tornaram-se rotina para a avaliação do potencial mutagênico de agentes químicos. Existem também muitos ensaios para avaliação das alterações imunológicas, baseando-se na quantificação e identificação de mediadores produzidos pelas células, facilitando a compreensão dos processos bioquímicos que ocorrem na inflamação. Existem casos em que estes agentes químicos podem provocar liberações excessivas de mediadores pelas células, gerando citotoxicidade (ROITT et al., 2003).

Segundo Marques (2002), frações metanólicas de *Styrax camporum Pohl*, uma árvore do cerrado brasileiro, foram capazes de induzir a liberação do TNF-alfa, além de estimular a enzima óxido nítrico sintetase induzível (iNOS), responsável pela produção de NO, por macrófagos peritoneais de camundongos *in vitro*. Burger et al. (1997), verificaram que extratos de *Echinacea purpurea* também são capazes de induzir a secreção celular de TNF-alfa.

Frente aos exemplos citados sobre os efeitos adversos de algumas plantas usadas como medicinais, verifica-se a importância da expansão dos estudos sobre os riscos e benefícios do uso das

mesmas. Atualmente, o Projeto Temático Biota, financiado pela FAPESP, reúne pesquisadores nas áreas química, farmacológica e biológica, com o objetivo de pesquisar novas moléculas farmacologicamente ativas, obtidas de plantas pertencentes à flora brasileira. Outros objetivos desse projeto também envolvem a tentativa de conciliar o conhecimento popular e científico, além de promover a estruturação do manejo sustentável da biodiversidade no país.

1.2. Flora do Cerrado Brasileiro

No Brasil, existe uma flora bastante diversificada, em toda a sua extensão, com vegetações de diferentes características e cujos princípios ativos são desconhecidos. De um modo geral, as matas nativas são as maiores representações da riqueza de espécies da flora brasileira. No Estado de São Paulo, são características as vegetações do Cerrado e Mata Atlântica, com grande quantidade de espécies a serem estudadas, muitas delas de uso popular. Esse dado reforça a necessidade da realização de estudos que caracterizem essas plantas quanto ao potencial farmacológico, biológico e tóxico (NAPOLITANO et al., 2005).

A família Malpighiaceae é formada por aproximadamente 800 espécies, distribuídas em 60 gêneros, de ocorrência em regiões tropicais (Norte, Nordeste e Região Central do Brasil), América Central e Guianas. No Nordeste brasileiro, ocorrem diversas espécies dos gêneros *Byrsonima*, *Camarea*, *Galphimia*, *Stigmaphyllon* e *Peixotoa*. Apesar desse grande número de espécies vegetais, pouco é conhecido acerca da constituição química da família. Poucos trabalhos na literatura reportam a presença, em geral, de triterpenos, flavonóides e esteróides em algumas espécies (DAVID & SANTOS, 2003). Esses vegetais apresentam diferentes tipos de habitat, frutos e caracteres

citogenéticos. Em geral, as espécies arbustivas e arbóreas são muito comuns (LOMBELLO & MARTINS, 2003).

No Brasil, a maior parte das espécies da família Malpigiaceae é conhecida por ser utilizada com finalidade terapêutica e como alimento. Desse modo, há uma crescente necessidade de mais estudos fitoquímicos com essas espécies (DAVID & SANTOS, 2003).

As espécies do gênero *Byrsonima* são conhecidas popularmente como “muricis” e, em geral, são plantas nativas do norte, nordeste e região central do Brasil, podendo também ser encontradas em algumas regiões serranas do Sudeste. São plantas com caracteres típicos das plantas do cerrado, geralmente arbóreas, com galhos retorcidos e porte médio, podendo chegar a 5 metros de altura. Os “muricis” do Brasil são muitos e variados, distinguindo-se pelas cores e locais de ocorrência. Assim, são conhecidos como “murici branco”, “murici amarelo”, “murici vermelho”, “murici da chapada”, “murici do brejo”, “murici da mata”, entre outros. São plantas de fácil adaptação, se desenvolvendo bem em solos areno-argilosos, com clima quente e boa ventilação. A fase de floração e frutificação ocorre durante todo o ano, dependendo da ocorrência das chuvas. Muitas espécies de murici fornecem frutos bastante consumidos e apreciados (por exemplo, a reputada acerola, rica em vitamina C), que são base da alimentação de algumas populações nas mais variadas preparações culinárias (no Nordeste, por exemplo, frutos da espécie *Byrsonima crassifolia*, amassados com farinha, fornecem a “cambica de murici”, rica em gorduras e de alto teor nutritivo). O cultivo e colheita dessas plantas ainda são bastante rudimentares, não existindo dados e parâmetros agrônômicos seguros. No Estado do Pará, por exemplo, há um grande interesse em desenvolver pesquisas agrônômicas com os muricizeiros, devido ao grande consumo das frutas dessas plantas nessa região (PIMENTEL GOMES, 2005).

1.2.1. *Byrsonima crassa* Niedenzu

Byrsonima crassa Niedenzu pertence à Família Malpighiaceae, Gênero *Byrsonima*. É conhecida popularmente como “murici vermelho” ou “murici do cerrado”. Suas folhas e cascas são utilizadas na medicina popular em tratamento de infecções cutâneas, picadas de cobra, disfunções gástricas e diarreias (BRITO et al., 2003). O estudo fitoquímico dos extratos da espécie, através de metodologias espectroscópicas, resultou no isolamento da mistura de ácido gálico e galato de metila, quercetina-3-O-alfa-L-piranosídeo e a mistura de quercetina-3-O-beta-D-glucopiranosídeo e quercetina-3-O-beta-D-galactopiranosídeo (FONSECA et al., 2005). A avaliação do perfil cromatográfico de frações dos extratos revelou a presença de catequinas e flavonóides (RODRIGUES et al., 2004). 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, importante em algumas doenças degenerativas, como Alzheimer (MONTOURO et al., 2005). A Figura 1 mostra a espécie *Byrsonima crassa* Niedenzu (murici do cerrado ou murici vermelho).

1.2.2. *Byrsonima intermedia* A.Juss.

De um modo geral, a espécie *Byrsonima intermedia* (Malpighiaceae), conhecida como “murici amarelo”, possui um perfil botânico bastante semelhante à *Byrsonima crassa*. Baseando-se em estudos etnofarmacológicos, se podemos dizer que as folhas e o tronco dessa planta são utilizados popularmente para diarreias, disfunções gástricas e úlceras (SANNOMIYA et al., 2004). O estudo fitoquímico revelou a presença de catequinas, derivados da quercetina, ácido gálico e galato de

metila e outros compostos isolados (SANNOMIYA et al., 2004). A Figura 2 mostra o aspecto da planta *Byrsonima intermedia* (murici amarelo).



Figura 1. *Byrsonima crassa* Niedenzu
(murici do cerrado)

Imagem obtida por scanear da planta
Autor da foto: Dr^a Miriam Sannomiya

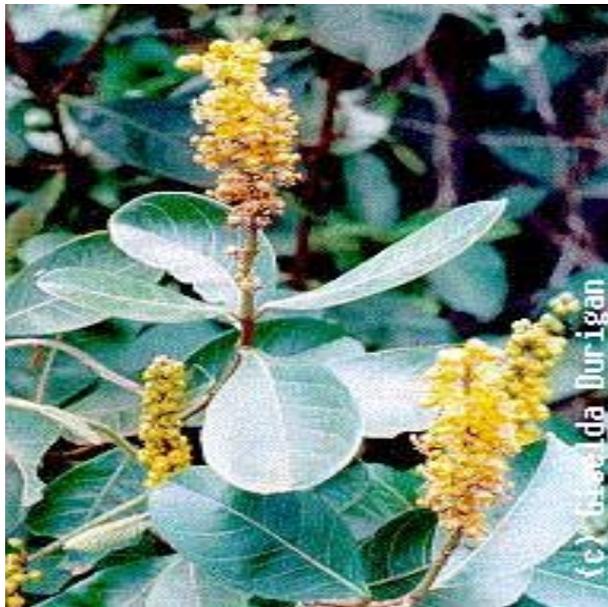


Figura 2. *Byrsonima intermedia* A.Juss.
(murici amarelo)

Imagem obtida do site: www.google.com

1.3. Mutagenicidade

Mutações são definidas como qualquer alteração permanente no DNA e podem acontecer em células germinativas ou somáticas; envolvem mutações cromossômicas e mutações gênicas. A mutagenicidade é a capacidade de um agente químico ou físico causar alterações genéticas. Esses agentes podem ser mutágenos primários interagindo diretamente com a molécula de DNA, ou mutágenos secundários que, sofrendo reações metabólicas no organismo vivo, tornam-se mutagênicos (VARELLA et al., 2004).

Os estudos de genotoxicidade e anti-genotoxicidade 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). Muitas plantas utilizadas por grande número de pessoas podem possuir propriedades farmacológicas e, simultaneamente, também estar causando alterações no DNA (MARQUES et al. 2003).

É bem documentado que mutações gênicas atuam em etapas da carcinogênese e que os 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 genotóxicas (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 *Salmonella typhimurium* que, na presença do agente mutagênico, reverterem seu caráter auxotrófico para a síntese de histidina, crescendo em meios que não possuem este aminoácido. Os crescimentos das colônias revelam uma mutação reversa induzida pelo agente, e a contagem 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, ou seja, diferentes mutações causadas pelos agentes químicos. As mutações podem ser substituições de bases ou do tipo *frameshift* (AMES, 1983; MORTELMANS & ZEIGER, 2000).

1.4. Resposta imunológica

A inflamação é fundamentalmente uma resposta de defesa do organismo, visando destruir, amenizar ou circunscrever a ação de um agente agressor (MARQUES, 2002).

A resposta imune é mediada por uma variedade de células e moléculas solúveis que estas células secretam. Entre essas células, podemos destacar os macrófagos, células teciduais originadas do monócito do sangue periférico (ROITT et al., 2003). No processo inflamatório, os macrófagos promovem a eliminação de agentes estranhos por fagocitose e pela liberação de substâncias, como por exemplo, produtos reativos de nitrogênio, como o óxido nítrico (NO) (NAPOLITANO et al., 2005).

A interação entre macrófagos e linfócitos na resposta imunológica desencadeia mudanças morfológicas e funcionais na membrana do macrófago, alterando as suas propriedades gerais, inclusive de locomoção e aderência, secreção de substâncias quimioativas e fagocitose, no sítio de ação (MARQUES, 2002).

O NO é um mediador que regula as respostas imunes humorais e celulares na inflamação, possuindo tanto propriedades antiinflamatórias quanto pró-inflamatórias, dependendo do tipo e da fase da inflamação (MOILANEN & VAPAATALO, 1995). É produzido em muitos tecidos pela enzima óxido nítrico sintetase (NOS) durante a transformação catalítica da L-arginina em citrulina. Três isorformas da óxido nítrico sintetase já foram identificadas: a neuronal (nNOS), a endotelial (eNOS) e a induzível (Figura 3), expressa principalmente em macrófagos (NAPOLITANO et al., 2005). A reação bioquímica acontece em duas etapas (Figura 4). Na primeira, há formação de um composto intermediário, a N^G-hidroxi-L-arginina (NHA). Na segunda etapa, ocorre a conversão da NHA em NO e L-citrulina (ACHIKE & KWAN, 2003). O NO produzido por macrófagos tem papel crucial nos processos imunológicos antimicrobianos, antitumorais e antivirais (PUNTUREE et al., 2004). Existe, porém, um tênue limite de concentração tissular entre a não toxicidade às células do hospedeiro e a toxicidade necessária para a ação contra agentes invasores (FLORA FILHO & ZILBERSTEIN, 2000). O controle apropriado da homeostase do NO faz com que este mediador seja útil em eventos fisiológicos ou, por outro lado, seja citotóxico, devido a uma geração excessiva (ACHIKE & KWAN, 2003). Citocinas secretadas por linfócitos ativados regulam a síntese de NO pelos macrófagos (MOILANEN & VAPAATALO, 1995).

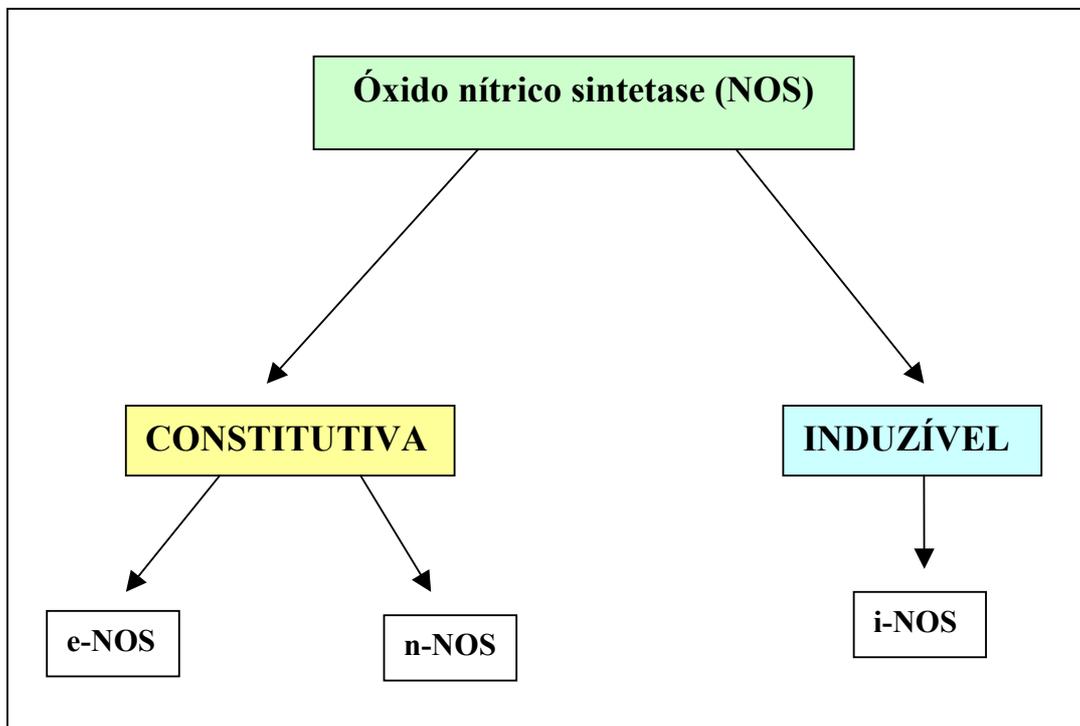


Figura 3. Óxido nítrico sintetase (isoformas) – (DUSSE, 2003).

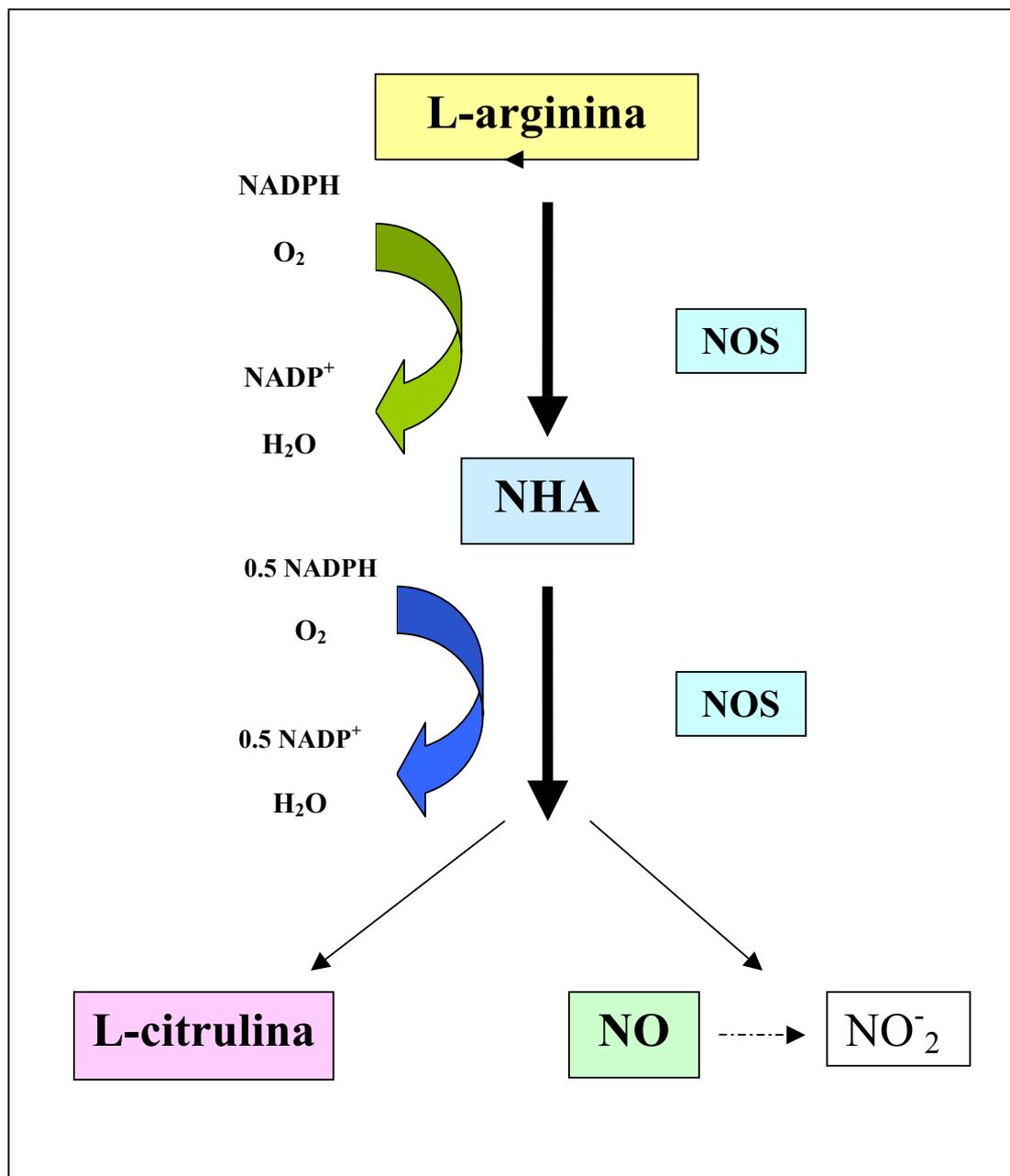


Figura 4. Reação bioquímica da síntese de NO (adaptado de MacMiccking et al., 1997).

O Fator de Necrose Tumoral-alfa (TNF- α) é uma citocina multifuncional, que possui funções centrais na inflamação aguda ou crônica, na resposta antitumoral (induzindo à morte apoptótica) e nas infecções (PALLADINO et al., 2003). As principais células produtoras de TNF- α são os monócitos e macrófagos (EIGLER et al., 1997).

Em geral, a ação do TNF- α pode ser benéfica ou maléfica, se produzido em altos níveis. Além da sua ação direta em células teciduais, pode favorecer a produção de outros mediadores da resposta inflamatória (PARHAM, 2001). Vários estudos têm sido descritos nos últimos anos, discutindo o papel do TNF- α em algumas patologias, como *sepsis*, meningites bacterianas, AIDS, artrite reumatóide e outras (GIBSON, 2004; METHE, 2004; SCHACHNA, 2004).

Com relação à sua função sobre a indução da morte de células tumorais, podemos caracterizar as proteínas da família TNF como ligantes de superfície celular, que interferem no mecanismo de ativação da cascata apoptótica via caspases, ou como proteína secretada (exemplo, o TNF- α). Além disso, o TNF age sobre a musculatura lisa vascular, promovendo o relaxamento do tônus celular, além de também estar envolvido na produção de substâncias vasodilatadoras endógenas, como o próprio NO, por indução da enzima óxido nítrico sintetase (MARQUES, 2002).

Atualmente, ensaios de liberação de NO em cultura de macrófagos fornecem importantes dados sobre a modulação imunológica ou capacidade citotóxica, dependendo de sua concentração. Altos níveis de produção de TNF-alfa e NO refletirão o potencial de estimulação imunológica, e o excesso pode contribuir para a indução de patologias inflamatórias (PUNTUREE et al., 2004).

Devido ao grande número de produtos naturais usados na medicina tradicional e popular, em muitos países, torna-se importante a caracterização da atuação desses compostos bioativos sobre o sistema imune, e no que se refere aos macrófagos, a avaliação da liberação de NO e TNF- α são

bastante consideráveis (CHOI & HUANG, 2005). Alguns trabalhos têm sido desenvolvidos para estabelecer a ativação da resposta imune por compostos de origem vegetal. Estudos de Lopes et al. (2005) revelaram a atividade antiinflamatória da espécie *Alchornea glandulosa*, planta do cerrado brasileiro, que inibiu consideravelmente a liberação de NO e TNF- α por macrófagos.

II. OBJETIVOS

Os objetivos do trabalho foram:

2.1. Avaliação da possível atividade mutagênica dos extratos clorofórmicos, metanólicos e hidroalcoólicos de *Byrsonima crassa* e *Byrsonima intermedia*, das frações acetato de etila e aquosa do extrato metanólico de *B. crassa* e as substâncias puras isoladas da fração acetato de etila do extrato metanólico de *B. crassa*, através de Teste de Ames, empregando as linhagens TA100, TA98, TA97a e TA102 de *Salmonella typhimurium*;

2.2. Avaliação do potencial de ação destes extratos e frações sobre o sistema imunológico, avaliando *in vitro* a possível interferência dos mesmos na produção de mediadores da resposta imune celular, com enfoque na produção de óxido nítrico (NO) e Fator de Necrose Tumoral- α (TNF- α).

III. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Obtenção do material vegetal

As folhas de *Byrsonima crassa* Niedenzu foram coletadas do Porto Nacional do Estado do Tocantins, Brasil, pela Prof^a Dr^a Clélia A. Hiruma-Lima. A autenticidade da amostragem foi feita pelo Prof. Eduardo Ribeiro dos Santos, por comparação com arquivos do Herbário da Universidade do Tocantins. A espécie padrão está depositada sob o registro no. 3377, no Herbário do Instituto de Biociências da Universidade do Tocantins.

As folhas de *Byrsonima intermedia* A.Juss. foram colhidas em Pratânia, São Paulo, Brasil. A identificação taxonômica foi estabelecida sob a referência n°. 24164, pelo Instituto de Biociências da UNESP de Botucatu.

3.2. Obtenção dos extratos, frações e compostos isolados de *B. crassa* Niedenzu e *B. intermedia* A.Juss.

Os extratos, frações e compostos isolados de *B. crassa* e *B. intermedia* fazem parte da relação de plantas do projeto Biota - FAPESP. As extrações foram realizadas no Instituto de Química da UNESP-SP, sob a coordenação do Prof. Dr. Wagner Vilegas.

3.2.1. Obtenção dos extratos de *B. crassa* Niedenzu e *B. intermedia* A.Juss.

Aproximadamente 2 kg de folhas da planta foram secos, triturados em moinho de facas e submetidos à exaustiva extração por maceração, em um recipiente com tampa, com clorofórmio,

metanol e uma mistura hidroalcoólica de metanol a 80%, 48 horas cada solvente, à temperatura ambiente e com agitação ocasional, com finalidade de evitar possíveis perdas de compostos químicos da matéria prima vegetal. Após os processos de extração, foi feita filtração em papel e o restante de solvente foi retirado sob pressão reduzida, obtendo-se os extratos clorofórmico, metanólico e metanólico a 80% secos, nas proporções (v/v) de 2,69, 7,91 e 4,79 g, respectivamente. Da mesma quantidade de folhas de *B. intermedia*, sob a mesma metodologia, foram obtidos extratos clorofórmico (16,7g), metanólico (85,2g) e hidroalcoólico (29,6g) secos.

3.2.2. Obtenção das frações do extrato metanólico de *B. crassa* Niedenzu

Análises por cromatografia em camada delgada do extrato juntamente com padrões de catequinas [(+)-catequina, (-)-epicatequina], flavonóides (rutina e quercetina) e revelação com reagentes específicos (NP/PEG, anisaldeído sulfúrico, iodo, UV em 254 e 365 nm) indicaram a presença de taninos, catequinas e flavonóides. A indicação da presença de saponinas foi verificada pela formação de espuma persistente quando da agitação de uma alíquota do extrato em um tubo de ensaio com água (SIMÕES et al., 2000). O extrato metanólico foi fracionado com uma mistura de acetato de etila e água (1:1 v/v), em três vezes. Uma porção de 10 g do extrato metanólico foi ressuspensa em água e extraída sucessivamente com acetato de etila (três tempos), produzindo a fração acetato de etila (4,8g) e a fração aquosa (3,0g). Análises por CCD mostraram que os flavonóides permaneceram majoritariamente na fase AcOEt enquanto que os derivados catequínicos e taninos permaneceram na fase aquosa.

A Figura 5 mostra o esquema de obtenção dos extratos de *B. intermedia* A.Juss. e *Byrsonima crassa* Niedenzu.

3.2.3. Obtenção dos compostos isolados a partir da fração acetato de etila do extrato metanólico de *B. crassa* Niedenzu

A porção AcOEt (4,30g) foi dissolvida em 15 mL de MeOH e submetida à centrifugação. O sobrenadante (4,1 g) foi fracionado em coluna de Sephadex LH-20 (57 cm X 3,0 cm d.i.) empregando como eluente metanol. Obtiveram-se 183 frações de 20 mL cada, as quais foram reunidas em 26 grupos de frações após análises cromatográficas por CCD (Anexo1).

A purificação de Fr. 50-60 (112mg) em coluna de sílica gel (18 cm x 1,0 cm d.i.), empregando como FM $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 75:25 (v/v) resultou no isolamento dos compostos ácido gálico e galato de metila, confirmados por RMN e CCD (revelação com anisaldeído sulfúrico). Purificação da Fr. 136-141 (95 mg) em coluna de celulose utilizando-se como eluente a mistura de $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 80:20 (v/v) permitiu o isolamento da amentoflavona (4,0mg). Análise cromatográfica por CCD e revelação com NP/PEG mostraram mancha de coloração amarelo-ouro indicando um flavonóide. Essa substância também foi confirmada por MS e RMN. O fracionamento sucessivo de Fr. 86-87 (122mg) em coluna de celulose e sílica gel resultou no isolamento uma mistura de compostos. Esta mistura quando revelada em anisaldeído sulfúrico produzia uma única mancha de vermelho intenso. Por RMN, detectou-se a presença de (+)-catequina e (-)-epicatequina. Após o fracionamento de Fr. 86-87 (54mg), como citado anteriormente, obteve-se um composto cuja análise cromatográfica por CCD e revelação em NP/PEG indicou um flavonóide. As análises por RMN revelaram a presença de quercetina-3-O- β -D-galactopiranosídeo. Analisando-se Fr. 93-95 (69mg) era possível observar a presença de um sólido amarelo. Assim, adicionou-se metanol e centrifugou-se. A análise por CCD do sólido centrifugado apresentou uma mancha alaranjada após revelação com NP/PEG, coloração característica de flavonóides. A análise por RMN e outras metodologias permitiu identificar o

composto como sendo de quercetina-3-*O*- α -L-arabinopiranosídeo. A Figura 6 mostra o esquema para obtenção das frações e compostos isolados do extrato metanólico das folhas de *B.crassa* Niedenzu.

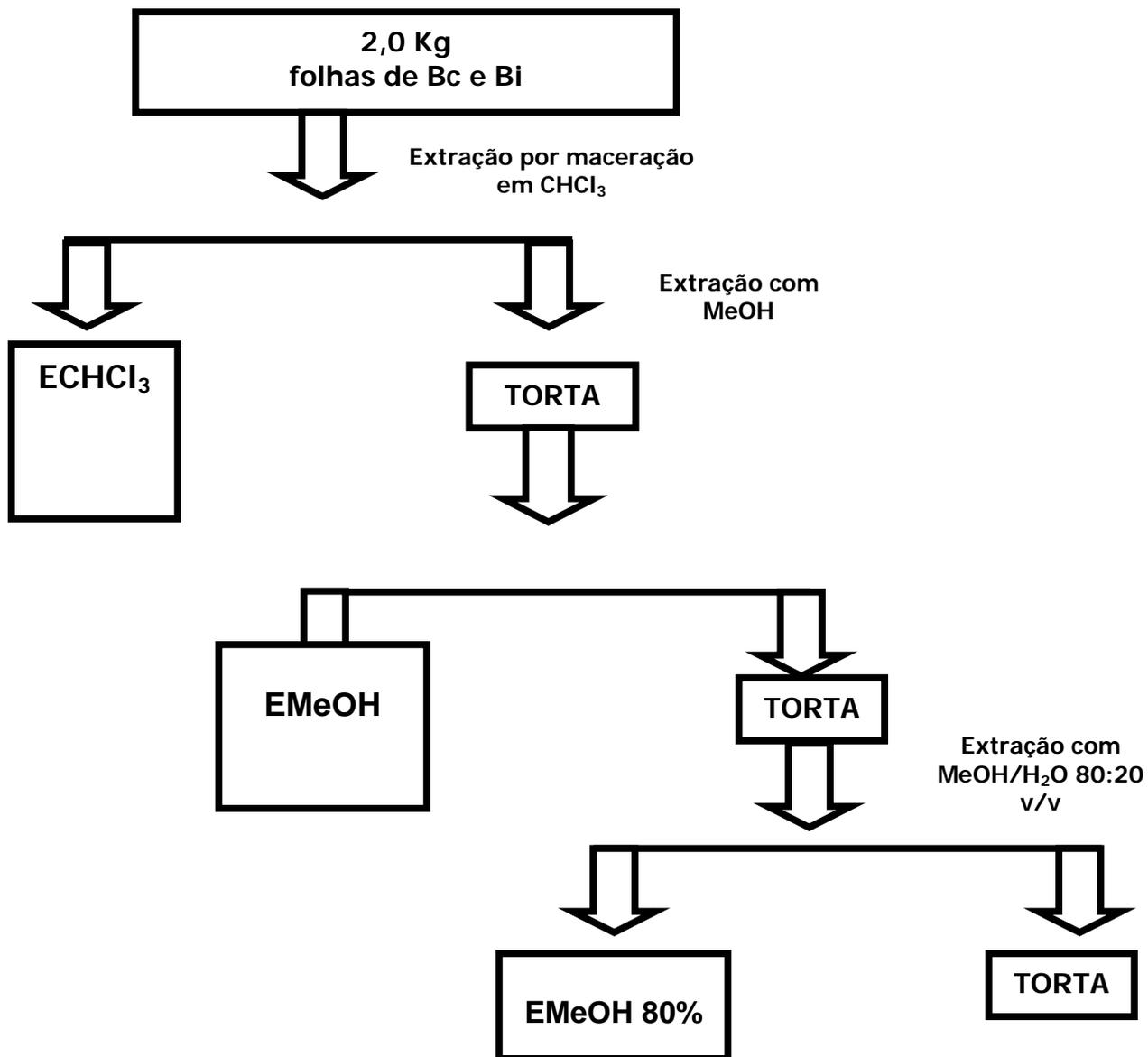


Figura 5. Fluxograma para a obtenção dos extratos de *B. crassa* (Bc) e *B. intermedia* (Bi).

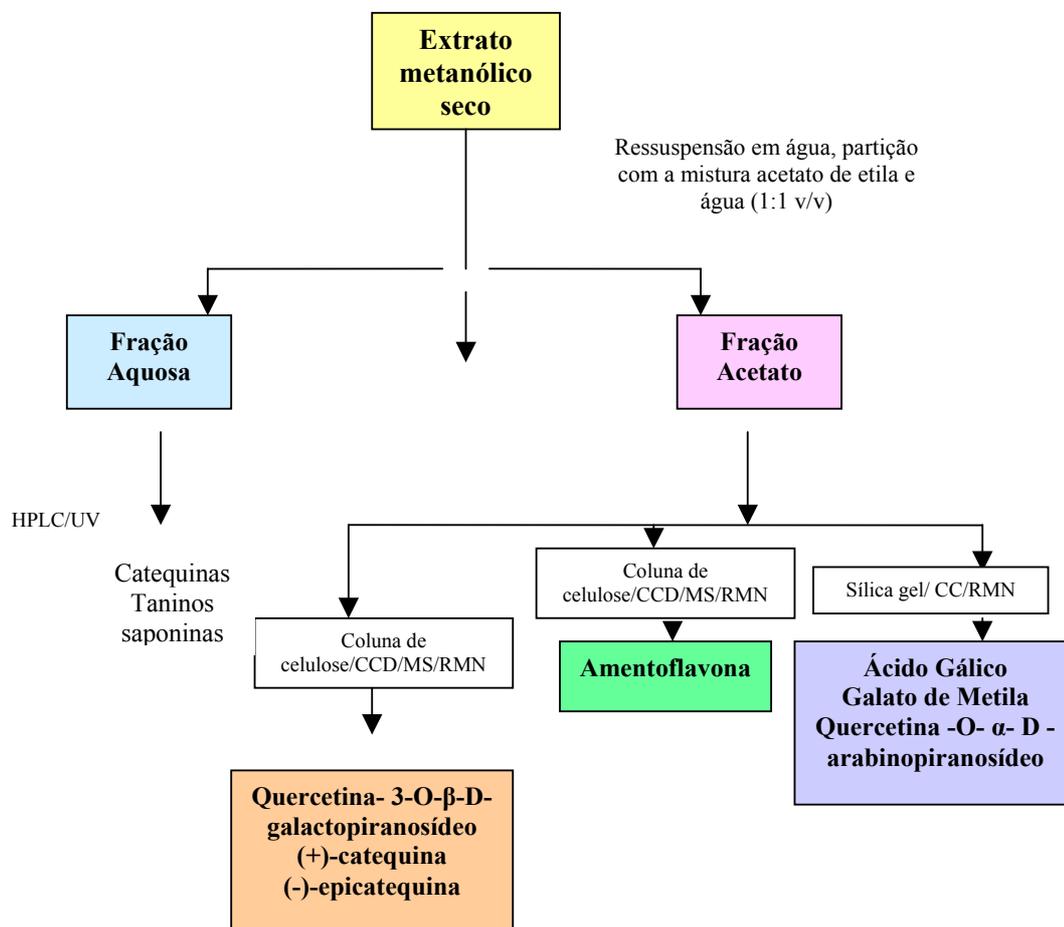


Figura 6. Representação esquemática para a obtenção das frações e compostos isolados do extrato metanólico das folhas de *Byrsonima crassa* Niedenzu.

3.3. Teste de Ames

3.3.1. Extratos, frações e compostos isolados

Os extratos, frações e compostos isolados foram inicialmente dissolvidos em DMSO, de acordo com o limite de solubilidade de cada um. As concentrações empregadas variaram entre 0,6 - 33,5 mg/placa para os extratos (metanólico, metanol/água e clorofórmico) de *B.crassa*; 0,4 - 8,82 mg/placa para as frações (acetato de etila e aquosa) de *B.crassa*; 0,06 - 1,31 para os compostos isolados (quercetina-3-*O*- β -D-galactopiranosídeo, quercetina-3-*O*- α -L-arabinopiranosídeo, amentoflavona, catequina e galato de metila) de *B.crassa* e 0,17 - 13,50 mg/placa para os extratos (metanólico, metanol/água e clorofórmico) de *B.intermedia*. As concentrações foram padronizadas em ensaios preliminares de toxicidade. A toxicidade era evidenciada pela redução no número de colônias revertentes e alteração do “background”.

3.3.2. Linhagens de *Salmonella typhimurium*

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

3.3.3. Manutenção e estoque das cepas, verificação das características genéticas

As cepas foram estocadas em tubos para congelamento (1,5mL) a -70°C , para manutenção das características genéticas. Para cada 0,9mL de cultura, foram acrescentados 0,1mL de DMSO, substância crioprotetora.

As características genéticas das cepas foram verificadas antes da estocagem, de acordo com as metodologias de Maron & Ames, (1983).

3.3.4. Preparo dos inóculos de *S. typhimurium*

Com alça de inoculação, pequena quantidade de cultura estoque foi semeada em 30 mL de caldo nutriente (Oxoid nº2), incubado a 37°C por 12-16hs, com agitação de 160 g, de modo a obter densidade de $1-2 \times 10^9$ bactérias/mL.

3.3.5. Meios de cultura

Os meios foram preparados de acordo com Maron & Ames (1983).

Foi utilizado Agar mínimo glicosado (20g de glicose, 15 g de Bacto-agar, 950mL de água destilada), acrescentado de meio Vogel Bonner “E” 50x concentrado (10g de sulfato de magnésio, 100g de ácido cítrico, 175g de fosfato de sódio e amônio, 500g de fosfato de potássio dibásico, 670mL de água destilada), na proporção de 980/20 mL, respectivamente.

O agar de superfície foi composto de 0,5g de cloreto de sódio, 0,6g de Bacto-Agar e 100mL de água destilada, acrescentado de 10mL de solução de L-histidina 0,096g/mL (Sigma) e D-biotina 0,123mg/mL (Sigma).

Os meios foram preparados e esterilizados em autoclave a 121°C por 15 min.

3.3.6. Preparo da mistura S9

Foi utilizada a fração microsossomal 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 cloreto de Mg 0,4M, cloreto de K 0,4 M, glicose-6P 1M, beta-NADP 0,1M, tampão fosfato 0,2M e água destilada, todos mantidos em gelo durante o experimento.

3.3.7. 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, azida sódica para TA100 e mitomicina C para TA102. Nos ensaios com ativação metabólica, foram usados 2-antramine para TA98, TA97a e TA100 e 2-aminofluoreno para TA102.

3.3.8. Ensaio de mutagenicidade

Foi usada a metodologia de pré-incubação, com e sem ativação metabólica (Figura 8), desenvolvida por Maron e Ames (1983). Diferentes concentrações dos extratos vegetais foram misturadas a 0,1mL 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. Após esse tempo, adicionou-se 2mL de agar superfície (“top agar”) suplementado com traços de histidina e biotina,

homogeneizou-se levemente e plaqueou-se em meio mínimo glicosado. Após solidificação do “top-agar”, as placas foram incubadas por 48 horas, a 37 °C. Após esse período, foi realizada a contagem do número de colônias revertentes por placa. O ensaio foi realizado em triplicata. A Figura 7 mostra o esquema do ensaio de mutagenicidade, com e sem ativação metabólica.

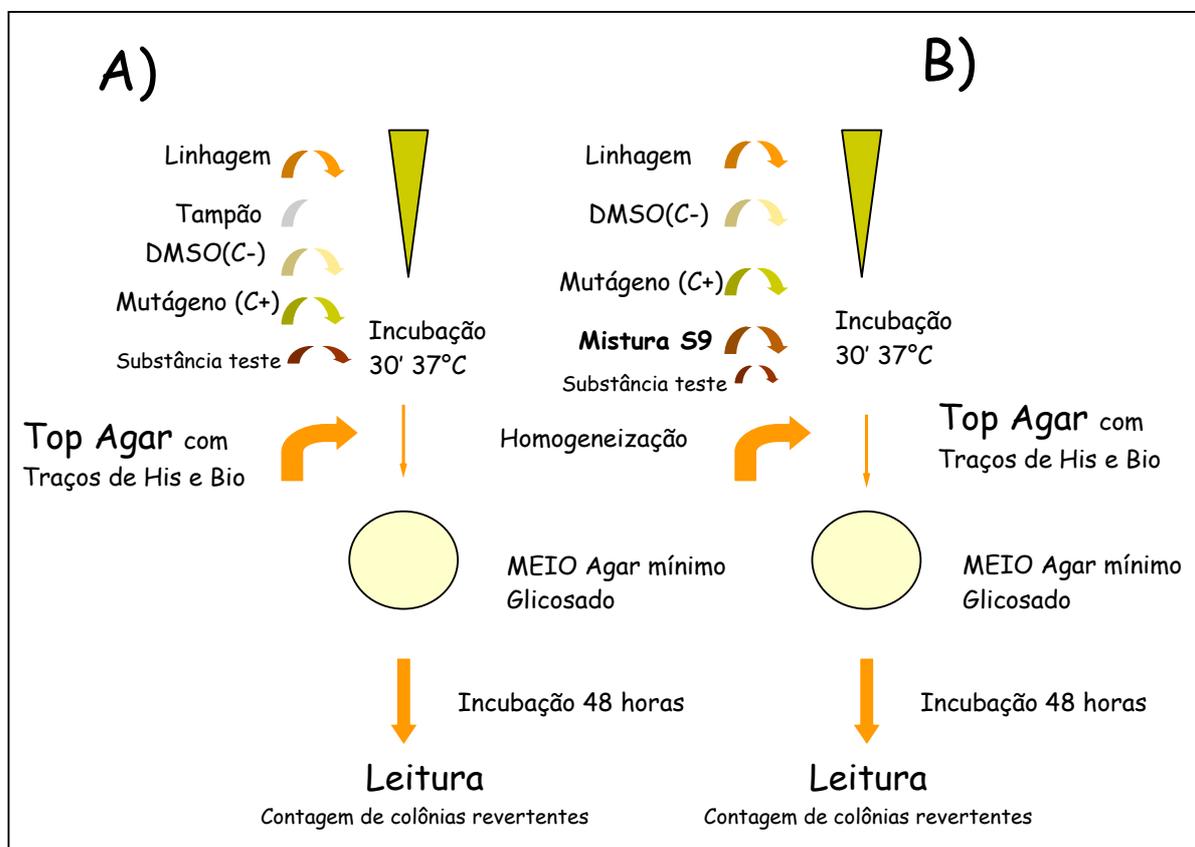


Figura 7. Teste de Ames (esquema) – A) sem ativação metabólica; B) com ativação metabólica.

3.4. Ensaios Imunológicos

3.4.1. Animais

Foram utilizados camundongos Swiss machos de 6 semanas, pesando entre 18 e 25 gramas, fornecidos pelo Biotério Central da Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP, situado na cidade de Araraquara. Estes foram mantidos em gaiolas de policarbonato, com água e ração (Purina) “ad libitum” em local climatizado ($23^0 \pm 2^0$ C, 56 + 2% de umidade relativa do ar), com controle de claro e escuro a cada período de 12 horas.

3.4.2. Obtenção de Células Peritoneais (PEC)

Os camundongos foram inoculados, intraperitonealmente, com 3 mL de solução de tioglicolato de sódio (Difco) a 3%. Após três dias, os animais foram sacrificados em câmara de vidro contendo clorofórmio. Após a morte e exposição do peritônio, abrindo-se a pele do animal, injetou-se 5,0 mL de tampão fosfato estéril (PBS pH 7,2), com seringa e agulha estéreis, realizando-se leve massagem manual. As células foram coletadas do peritônio com a mesma seringa e agulha e acondicionadas em um tubo estéril (Corning, Inc), sendo mantidas em banho de gelo. Para o preparo da suspensão celular, centrifugou-se três vezes a 200 g durante 5 minutos em centrífuga (Fanem) à temperatura ambiente. As células sedimentadas foram resuspensas em meio de cultura RPMI – 1640 (Sigma) suplementado com 5% de soro fetal bovino, 1U/mL de estreptomicina, 1U/mL de penicilina e 5×10^{-2} M β -mercaptoetanol e assim designado como RPMI completo (RPMI-1640-C). O número de células foi determinado pela contagem em câmara hemocitométrica tipo Neubauer (Boeco, Germany), utilizando-se corante vital líquido de Lázarus, sendo ajustado para a concentração de

5×10^6 células/mL em meio RPMI completo. As células assim ajustadas foram incubadas em estufa a 37°C , com tensão constante 5 % CO_2 (Forma Scientific) para formação do tapete celular, ou seja, cultura de macrófagos peritoneais. A Figura 8 mostra o esquema de obtenção das PEC.

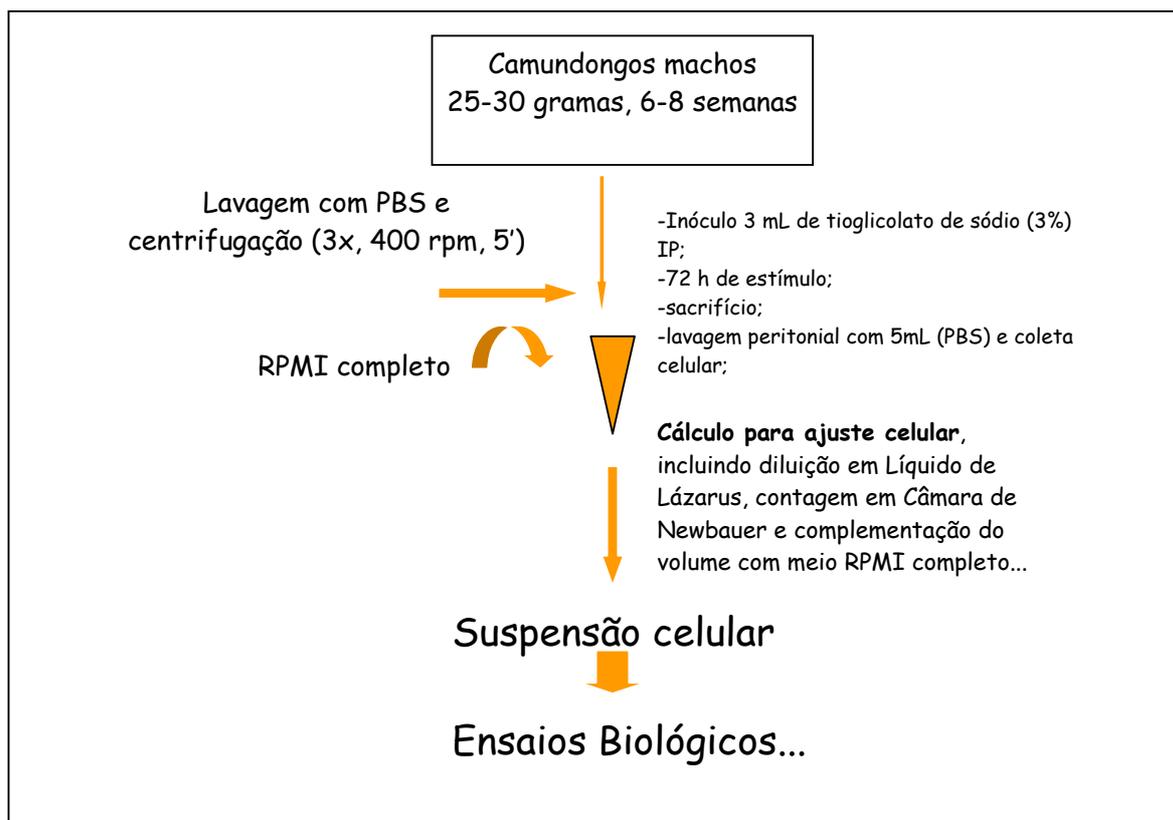


Figura 8. Esquema de obtenção das células de exudato peritoneal de camundongos Swiss (PEC) para os ensaios imunológicos.

3.4.3. Ensaio de citotoxicidade

Os ensaios de viabilidade celular foram realizados no Laboratório de Microbiologia Clínica do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP, sob a coordenação da Prof^a.Dr^a. Maria Stella Gonçalves Raddi. A metodologia empregada foi a do Vermelho Neutro (BORENFREUND & PUERNER, 1985; BALBICH & BORENFREUND, 1998). O potencial tóxico foi avaliado após o contato por 18h de 100µL de cultura de macrófagos peritoneais a 5×10^6 células/mL com 100µL de cada extrato e fração de *B.crassa* e *B.intermedia* nas concentrações 15, 31, 62, 125, 200, 250, 280, 350, 400 e 500 µg/mL. O meio livre de células foi desprezado e 100µL de uma solução de vermelho neutro (VN) 0,05 mg/mL diluído em RPMI-1640 foram adicionados à placa de cultura e incubados por 3 h em estufa (Forma Scientific, Inc.), a 37°C e com tensão constante de CO₂ a 5%. Após lavagem com PBS, as células viáveis foram coradas e solubilizadas com 100µL de uma solução de ácido acético e etanol. A leitura da absorbância foi feita a 540 nm, com um filtro de referência de 620 nm. Os ensaios de citotoxicidade do DMSO também foram realizados, utilizando porcentagens do solvente em meio RPMI-1640, variando de 0-10 %. Verificou-se que a viabilidade celular foi satisfatória até uma concentração de 2% de DMSO, com uma viabilidade celular de 99,89%. As preparações dos extratos e frações de *B.crassa* e *B.intermedia* utilizadas nos ensaios imunológicos não possuíram mais que 2% de DMSO.

3.4.4. Determinação da liberação de Óxido Nítrico

A suspensão celular de macrófagos peritoneais de camundongos ajustada a 5×10^6 cels/mL e os extratos vegetais foram diluídos em meio RPMI completo nas maiores concentrações não tóxicas, determinadas nos ensaios de citotoxicidade. Foram utilizados 100µl da suspensão celular/cavidade e

100µl da diluição de cada extrato em placa estéril de 96 cavidades planas. Em outras cavidades foram acondicionados 100µl de LPS de *E.coli* sorotipo 0111: B4 a 10µg/mL em meio RPMI-1640C, como controle positivo ou 100µl de meio sem a presença de extrato, como controle negativo. Incubou-se a placa em estufa a 37°C, com tensão constante de CO₂ a 5% por 24 horas. Após esse período, foram transferidos 50µl para nova placa e adicionados, em cada cavidade, mais 50µl de reagente de Griess, composto de N-(1-naftil)-etilenodiamino (Merck), sulfonilamida (Merck) e ácido ortofosfórico (Mallinckrodt Chemical) (GREEN et al., 1982). Após 10 min. de incubação à temperatura ambiente, a leitura foi feita em espectrofotômetro UV/Visível (Multiskan Ascent Labsystem Research Tech. Div., Helsinki, Finland), com filtro de 540nm. As concentrações de nitrito foram obtidas a partir de uma curva padrão prévia, preparada com concentrações µmolares conhecidas de NaNO₂. A Figura 9 mostra o esquema do ensaio de determinação de NO.

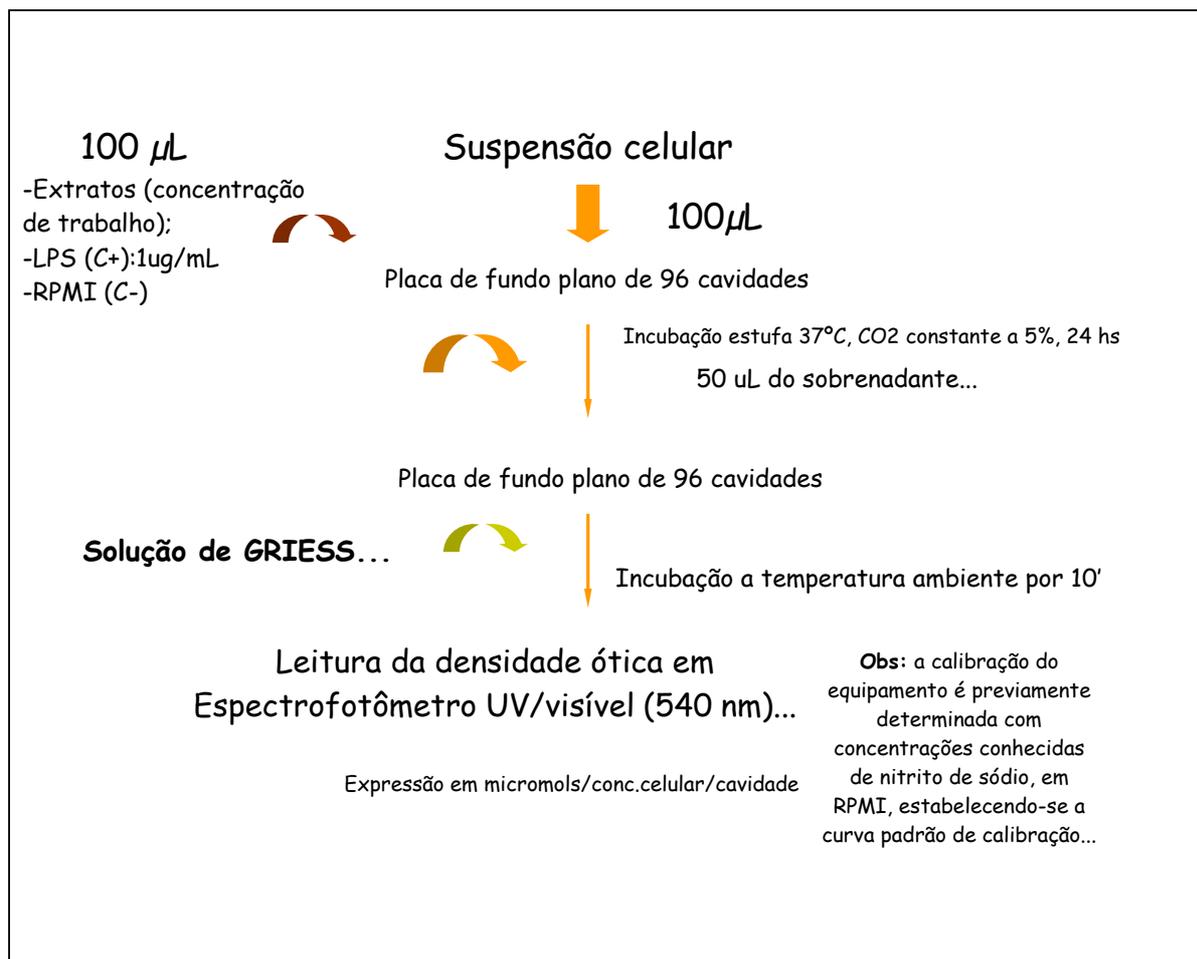


Figura 9. Esquema do ensaio de liberação de NO por macrófagos peritoneais de camundongos Swiss.

3.4.5. Determinação da liberação do Fator de Necrose Tumoral (TNF-alfa)

3.4.5.1. *Obtenção do sobrenadante*

A suspensão celular de 5×10^6 células/mL como previamente descrita, foi incubada com a concentração ideal de cada extrato e fração. Os controles foram os mesmos utilizados na determinação de NO. Após incubação de 24 horas em estufa a 37°C , com tensão constante 5% CO_2 , a placa foi centrifugada a 4°C por 20 min a 1000 g e os sobrenadantes estocados em freezer a -20°C até o momento da determinação do TNF-alfa. A Figura 10 mostra o esquema para a obtenção dos sobrenadantes das PEC na presença dos extratos e frações.

3.4.5.2. *Bioensaio para TNF-alfa*

O ensaio baseia-se na capacidade do TNF-alfa em lisar células tumorais (CARSWELL et al., 1975). As células utilizadas foram da linhagem L929, cultivadas em meio Eagle, com 7,5% de soro fetal bovino (Cultilab) inativado.

As células L929 foram contadas em câmara de Neubauer e ajustadas a uma densidade de 4×10^5 cels/mL de meio RPMI –1640C e acondicionadas em uma placa (100 μL /cavidade) e incubadas 18 h a 37°C , em tensão constante de CO_2 5%. Após incubação, 100 μl dos sobrenadantes das culturas de macrófagos incubados com os extratos, obtidos anteriormente, foram adicionados em cada cavidade e novamente incubados por 24 horas, nas mesmas condições anteriores. Os sobrenadantes foram então desprezados e as células coradas com cristal violeta (0,2% em metanol 20%), por 30 min em temperatura ambiente. A seguir, foi adicionado lauril-sulfato de sódio para

solubilizar as células coradas e a absorbância de cada orifício foi obtida a 495nm em leitor de ELISA (Multiskan Ascent Labsystem). A Figura 11 mostra o esquema do bioensaio para TNF- α .

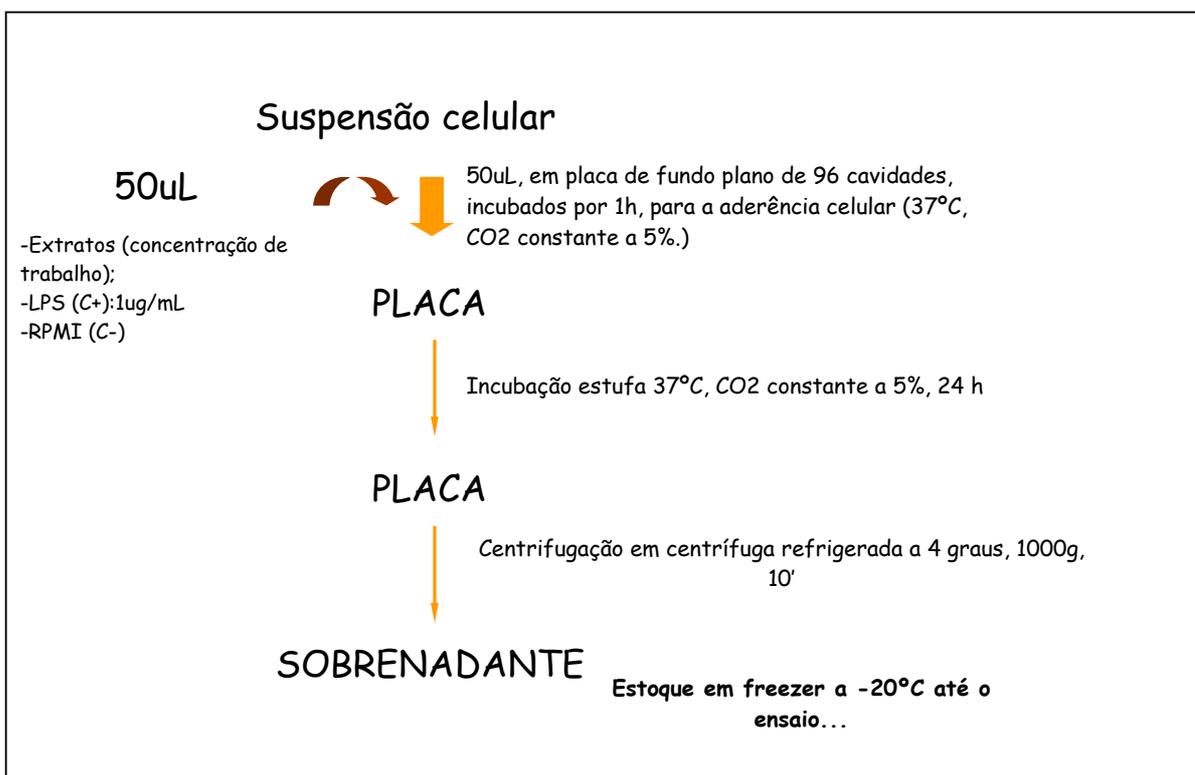


Figura 10. Esquema de obtenção dos sobrenadantes das culturas de PEC em presença dos extratos e frações de *B.crassa* e *B.intermedia*.

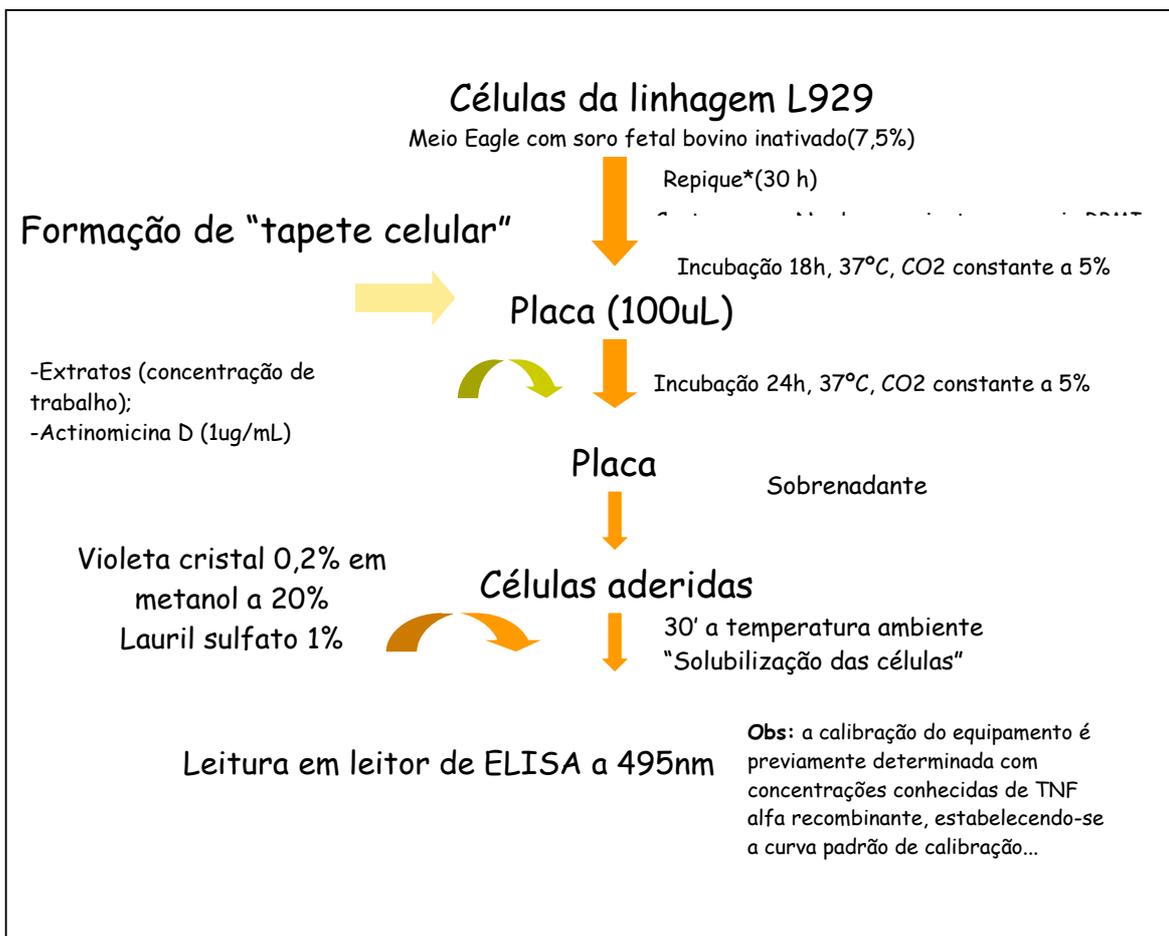


Figura 11. Esquema do ensaio de liberação de TNF- α por macrófagos peritoneais de camundongos Swiss.

3.5. Análise Estatística

3.5.1. Teste de Ames

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 pelo cálculo da 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 dois em pelo menos duas concentrações e houve um efeito dose-resposta significativo. O teste foi negativo quando não induziu aumento significativo de revertentes e suas RM foram menores que dois.

3.5.2. Ensaio imunológico

A análise estatística foi realizada através de análise de variância (ANOVA), utilizando o teste Tukey, através do programa Graph Pad InStat. O nível de significância de 5% foi considerado significativo. Não existem, na literatura, até o momento, resultados que evidenciem valores exatos para referenciais normais para NO e TNF-alfa. Dessa forma, são empregados parâmetros comparativos entre os valores detectados na amostra e os valores detectados no controle positivo LPS. De maneira geral, foram consideradas elevadas as concentrações de NO e TNF-alfa maiores que 50% daquela liberada no controle positivo (LPS).

IV. RESULTADOS

4.1. Teste de Ames com extratos, frações e compostos isolados de *B.crassa* Niedenzu

Tabela 1 mostra os resultados obtidos com os extratos de *B.crassa*. O extrato metanólico apresentou atividade mutagênica positiva nos ensaios com a linhagem TA98 sem ativação metabólica, ou seja, apresentou valores dose-resposta significativos e valores de RM maiores que dois para as duas concentrações. Após a metabolização, a dose-resposta ainda foi significativa em algumas concentrações, porém os valores de RM foram menores ou próximos a dois. Esses resultados demonstram que a atividade mutagênica desse extrato é reduzida pela metabolização das enzimas hepáticas. 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.

O extrato hidroalcoólico apresentou indícios de mutagenicidade apenas com a linhagem TA98 sem metabolização, sendo negativos os demais resultados. O extrato clorofórmico apresentou resultados negativos com todas as linhagens, com ou sem ativação metabólica.

Pelo fato de somente o extrato metanólico ter induzido mutagenicidade positiva, procedeu-se a avaliação das frações aquosa e acetato de etila, obtidas a partir desse extrato. A Tabela 2 mostra os resultados obtidos. 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 estejam presentes nessa fração.

Os resultados obtidos com os compostos catequina, galato de metila, quercetina galactopiranosídeo, quercetina arabinopiranosídeo e amentoflavona, extraídos da fração acetato do extrato metanólico de *B.crassa* testados com a linhagem TA98 estão na Tabela 3. O ensaio foi realizado com a quercetina pura (Sigma), com a finalidade de compararmos seu potencial mutagênico com as quercetinas ligadas a açúcares, presentes na fração. Verificamos que, nas maiores concentrações testadas, a quercetina arabinopiranosídeo apresentou fortes indícios de mutagenicidade, com significância dose-resposta e RM próximos a dois sem ativação metabólica. Após a metabolização, a atividade mutagênica foi reduzida, permanecendo a significância dose-resposta nas duas maiores concentrações testadas. A quercetina galactopiranosídeo não apresentou atividade mutagênica nas concentrações testadas, que foram inferiores àquelas testadas com a quercetina arabinopiranosídeo, devido à pequena quantidade de composto isolado disponível para os testes. Já a amentoflavona apresentou atividade mutagênica 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. O índice de toxicidade não foi evidenciado na concentração 1,12 mg/placa.

4.2. Teste de Ames com extratos de *B. intermedia* A.Juss.

Os resultados do extrato metanólico dessa espécie apresentaram efeito dose-resposta significativo na maioria das concentrações testadas apenas com a linhagem TA98, com e sem ativação metabólica. Nas maiores concentrações testadas com essa linhagem, os valores de RM chegaram a 1,7, o que evidencia indícios de mutagenicidade. Com a linhagem TA100, também se verificou efeito dose resposta significativo e valores de RM até 1,6, evidenciando indícios de mutagenicidade apenas nos testes sem metabolização. Os extratos hidroalcoólico e clorofórmico

não apresentaram atividade mutagênica em todas as linhagens testadas. A Tabela 4 mostra os resultados dos ensaios de mutagenicidade obtidos com os extratos de *B.intermedia*.

Tabela 1. Atividade mutagênica expressa pela média \pm desvio padrão do número de revertentes/placa nas linhagens bacterianas TA98, TA100, TA97a e TA102 expostas aos extratos de *Byrsonima crassa*, em várias concentrações, com metabolização (+S9) ou sem metabolização (-S9).

Tratamentos (mg/placa)	Revertentes/placa com linhagens de <i>Salmonella typhimurium</i>							
	TA98		TA97a		TA100		TA102	
	-S9 ^a	+S9 ^b	-S9 ^a	+S9 ^b	-S9 ^c	+S9 ^b	-S9 ^c	+S9 ^d
MeOH								
0	28 \pm 2,3	40 \pm 8,6	125 \pm 3,1	133 \pm 1,2	195 \pm 14,1	194 \pm 1,0	249 \pm 42,0	248 \pm 12,6
1,2	35 \pm 4,6 (1,2)	-	125 \pm 1,2 (1,0)	131 \pm 1,2 (0,9)	217 \pm 26,1 (1,1)	-	199 \pm 15,2 (0,8)	232 \pm 9,5 (0,9)
2,5	36 \pm 4,4 (1,3)	43 \pm 9,0 (1,1)	125 \pm 3,2 (1,0)	130 \pm 2,0 (0,9)	206 \pm 18,0 (1,1)	189 \pm 0,6 (0,9)	188 \pm 10,0 (0,8)	234 \pm 5,9 (0,9)
5,3	33 \pm 3,2 (1,2)	-	126 \pm 2,1 (1,0)	134 \pm 0,6 (1,0)	236 \pm 14,6 (1,2)	192 \pm 1,2 (0,9)	197 \pm 4,2 (0,8)	243 \pm 17,4 (1,0)
7,5	-	61 \pm 3,5* (1,5)	118 \pm 2,3 (0,9)	133 \pm 1,0 (1,0)	-	195 \pm 0,6 (1,0)	-	-
10,6	50 \pm 2,7* (1,8)	-	-	-	320 \pm 12,0* (1,6)	198 \pm 2,0 (1,0)	232 \pm 5,5 (0,9)	239 \pm 6,0 (1,0)
15,9	61 \pm 4,2* (2,2)	61 \pm 3,5* (1,5)	-	-	342 \pm 17,5* (1,8)	198 \pm 1,2 (1,0)	276 \pm 14,2 (1,1)	263 \pm 10,1 (1,2)
21,2	64 \pm 3,1* (2,3)	76 \pm 11,1* (1,9)	-	-	347 \pm 17,0* (1,8)	232 \pm 1,2 (1,2)	292 \pm 10,0 (1,2)	286 \pm 7,8 (1,2)
MeOH/H₂O								
0	48 \pm 8,4	53 \pm 2,3	125 \pm 3,1	133 \pm 1,2	187 \pm 22,9	194 \pm 1,0	249 \pm 42,0	248 \pm 12,6
0,6	-	-	125 \pm 0,6 (1,0)	131 \pm 4,6 (0,9)	197 \pm 4,1 (1,0)	187 \pm 6,1 (0,9)	238 \pm 26,4 (0,9)	234 \pm 7,4 (0,9)
1,2	-	-	127 \pm 1,2 (1,0)	133 \pm 1,0 (1,0)	174 \pm 5,5 (0,9)	182 \pm 9,2 (0,9)	240 \pm 10,1 (0,9)	240 \pm 6,7 (1,0)
2,5	51 \pm 3,1 (1,1)	52 \pm 6,1 (0,9)	128 \pm 2,0 (1,0)	129 \pm 1,2 (0,9)	172 \pm 2,1 (0,9)	185 \pm 8,3 (0,9)	-	231 \pm 7,0 (0,9)
4,2	-	54 \pm 3,6 (1,0)	-	130 \pm 2,0 (0,9)	-	180 \pm 2,5 (0,9)	246 \pm 3,6 (1,0)	-
6,3	-	-	120 \pm 2,3 (0,9)	-	175 \pm 12,1 (0,9)	-	236 \pm 10,9 (0,9)	242 \pm 17,6 (1,0)
8,4	71 \pm 2,0* (1,5)	54 \pm 3,5 (1,0)	-	133 \pm 1,2 (1,0)	170 \pm 20,5 (0,9)	184 \pm 1,1 (0,9)	-	-
13,5	-	-	-	-	-	-	213 \pm 16,8 (0,9)	259 \pm 8,2 (1,0)
16,7	74 \pm 3,5* (1,5)	56 \pm 2,9 (1,1)	-	-	-	-	-	-
25,1	83 \pm 6,1* (1,7)	56 \pm 3,2 (1,1)	-	-	-	-	-	-
33,5	83 \pm 6,4* (1,7)	57 \pm 6,0 (1,1)	-	-	-	-	-	-
CHCl₃								
0	28 \pm 2,3	40 \pm 8,6	125 \pm 3,1	133 \pm 1,2	155 \pm 4,3	194 \pm 1,0	249 \pm 42,0	248 \pm 12,6
0,2	-	-	123 \pm 1,2 (1,0)	127 \pm 1,2 (0,9)	-	-	-	-
0,4	-	-	119 \pm 1,2 (0,9)	129 \pm 0,6 (0,9)	-	-	-	-
0,7	32 \pm 1,2 (1,1)	-	118 \pm 2,0 (0,9)	134 \pm 1,7 (1,0)	161 \pm 1,5 (1,0)	198 \pm 1,0 (1,0)	260 \pm 30,7 (1,0)	246 \pm 2,7 (1,0)
1,5	32 \pm 2,0 (1,1)	32 \pm 6,7 (0,8)	117 \pm 1,2 (0,9)	135 \pm 1,0 (1,0)	162 \pm 7,1 (1,1)	195 \pm 15,6 (1,0)	213 \pm 20,9 (0,9)	250 \pm 14,6 (1,0)
3,0	33 \pm 3,0 (1,2)	-	-	135 \pm 1,0 (1,0)	164 \pm 9,6 (1,1)	196 \pm 9,2 (1,0)	240 \pm 34,2 (1,0)	264 \pm 8,0 (1,1)
6,0	33 \pm 2,3 (1,2)	36 \pm 4,2 (0,9)	-	-	163 \pm 2,1 (1,1)	204 \pm 6,0 (1,0)	283 \pm 14,0 (1,1)	265 \pm 2,0 (1,1)
9,0	34 \pm 2,1 (1,2)	31 \pm 8,0 (0,8)	-	-	168 \pm 4,7 (1,1)	216 \pm 5,3 (1,1)	301 \pm 12,8 (1,2)	270 \pm 7,6 (1,1)
12,0	34 \pm 2,1 (1,2)	34 \pm 2,7 (0,9)	-	-	165 \pm 6,1 (1,1)	-	286 \pm 15,7 (1,2)	267 \pm 4,4 (1,1)
Controle +	920 \pm 8,6	817 \pm 1,8	812 \pm 1,7	914 \pm 9,5	951 \pm 7,8	586 \pm 6,7	1021 \pm 2,1	1129 \pm 6,0

MeOH (Extrato metanólico); CHCl₃ (Extrato clorofórmico); MeOH/H₂O (Extrato metanol/água); 0=controle negativo (DMSO=100 μ l/placa); Controle + \rightarrow -S9: 4-nitro-*o*-fenilenodiamina (5 μ g/placa) para TA5 e TA97a; Azida sódica (1.25 μ g/placa) para TA100 e mitomicina (0.5 μ g/placa) para TA102. +S9 \rightarrow 2-antramina (0.125 μ g/placa) foi usado em todas as linhagens. * $P < 0.05$ (ANOVA). Os valores e parênteses=razões de mutagenicidade.

Tabela 2. Atividade mutagênica expressa pela média \pm desvio padrão do número de revertentes/placa nas linhagens bacterianas TA98, TA100, TA97a e TA102 expostas às frações aquosa e acetato de etila de *Byrsonima crassa*, em várias concentrações, com metabolização (+S9) ou sem metabolização (-S9).

Tratamentos mg/placa	Revertentes/placa em linhagens de <i>Salmonella thypimurium</i>							
	TA98		TA97a		TA100		TA102	
Fração aquosa	- S9 ^a	+S9 ^b	- S9 ^a	+S9 ^b	- S9 ^c	+S9 ^b	- S9 ^d	+S9 ^b
0	22 \pm 1,0	46 \pm 1,0	125 \pm 3,1	133 \pm 1,2	147 \pm 5,2	190 \pm 2,0	276 \pm 21,8	272 \pm 2,0
0,54	24 \pm 0,6(1,1)	-	123 \pm 1,0(0,9)	-	-	195 \pm 1,0(1,0)	285 \pm 5,2(1,0)	-
1,11	25 \pm 0,6(1,1)	42 \pm 1,7(0,9)	127 \pm 1,2(1,0)	129 \pm 0,6(0,9)	165 \pm 2,7(1,1)	198 \pm 1,0(1,0)	286 \pm 1,5(1,0)	270 \pm 2,0(0,9)
2,22	25 \pm 0,6(1,1)	42 \pm 0,6(0,9)	119 \pm 0,6(0,9)	132 \pm 2,1(1,0)	163 \pm 2,7(1,1)	202 \pm 1,0(1,1)	283 \pm 8,5(1,0)	274 \pm 1,0(1,0)
4,41	26 \pm 1,0(1,2)	44 \pm 1,7(1,0)	123 \pm 1,0(0,9)	133 \pm 4,2(1,0)	162 \pm 3,5(1,1)	211 \pm 1,0(1,1)	292 \pm 11,0(1,1)	277 \pm 3,1(1,0)
8,82	27 \pm 1,2(1,2)	45 \pm 1,0(1,0)	125 \pm 1,2(1,0)	131 \pm 1,2(0,9)	159 \pm 1,2(1,1)	212 \pm 1,0(1,1)	306 \pm 19,1(1,1)	277 \pm 1,2(1,0)
Controle+	328 \pm 6,0	238 \pm 1,5	812 \pm 1,7	914 \pm 9,5	1269 \pm 10,8	673 \pm 5,0	1168 \pm 6,6	1631 \pm 2,6
Fração acetato								
0	22 \pm 1,0	46 \pm 1,0	125 \pm 3,1	133 \pm 1,2	147 \pm 5,2	190 \pm 2,0	257 \pm 13,9	272 \pm 2,0
0,42	27 \pm 0,6(1,2)*	-	121 \pm 0,6(0,9)	-	-	199 \pm 1,0(1,1)	255 \pm 21,0(1,0)	-
0,84	32 \pm 2,5(1,5)*	44 \pm 1,2(1,0)	122 \pm 0,6(0,9)	127 \pm 0,6(0,9)	181 \pm 8,7(1,2)	213 \pm 1,0(1,1)	250 \pm 12,6(1,0)	268 \pm 5,5(0,9)
1,71	34 \pm 1,0(1,6)*	45 \pm 1,2(1,0)	124 \pm 0,6(1,0)	129 \pm 1,2(0,9)	189 \pm 2,0(1,3)	219 \pm 1,0(1,2)	262 \pm 26,3(1,0)	267 \pm 3,1(0,9)
3,42	34 \pm 1,5(1,6)*	47 \pm 1,0(1,0)	123 \pm 1,2(0,9)	133 \pm 1,2(1,0)	177 \pm 9,5(1,2)	220 \pm 1,0(1,2)	273 \pm 15,7(1,1)	275 \pm 2,3(1,0)
6,81	37 \pm 1,2(1,7)*	49 \pm 0,6(1,2)	127 \pm 1,2(1,0)	131 \pm 0,0(1,0)	181 \pm 9,5(1,2)	220 \pm 0,5(1,2)	270 \pm 7,0(1,1)	277 \pm 1,2(1,0)
Controle+	328 \pm 6,0	238 \pm 1,5	812 \pm 1,7	914 \pm 9,5	1269 \pm 10,8	673 \pm 5,0	1168 \pm 6,6	1631 \pm 2,6

0= controle negativo (DMSO – 100 μ L/placa). Controle+: controle Positivo: ^a NPD (4-nitro-*o*-fenilenodiamina - 10.0 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). **P* < 0.05 (ANOVA). Os valores em parênteses+razões de mutagenicidade.

Tabela 3. Atividade mutagênica expressa pela média \pm desvio padrão do número de revertentes/placa na linhagem bacteriana TA98 exposta aos compostos isolados da fração acetato do extrato metanólico de *Byrsonima crassa*, em várias concentrações, com metabolização (+S9) e sem metabolização (-S9).

Tratamento(mg/placa)	TA98 (-S9)	TA98 (+S9)
Controle negativo	37 \pm 5,6	28 \pm 0,7
Catequina		
0,04	35 \pm 2,5 (0,9)	-
0,16	49 \pm 0,6 (1,3)	26 \pm 4,2 (0,9)
0,48	41 \pm 5,2 (1,1)	25 \pm 1,4 (0,9)
0,79	-	27 \pm 3,5 (0,9)
1,06	51 \pm 6,6 (1,4)	-
Galato de Metila		
0,08	49 \pm 8,5 (1,3)	25 \pm 1,4 (0,9)
0,25	47 \pm 8,9 (1,3)	31 \pm 0,7 (1,1)
0,42	54 \pm 4,0* (1,5)	34 \pm 1,6 (1,2)
1,06	59 \pm 3,0* (1,6)	-
Quercetina (Sigma)		
0,05	1316 \pm 121,3**(35,6)	1173 \pm 60,8**(41,9)
0,15	1292 \pm 49,7**(34,9)	1216 \pm 178,9**(43,4)
0,30	1592 \pm 42,7**(43,0)	1367 \pm 72,1**(48,8)
0,50	1958 \pm 94,7**(52,9)	1242 \pm 76,3**(44,4)
Quercetina arabinopiranosídeo		
0,06	44 \pm 3,5 (1,2)	29 \pm 2,1(1,0)
0,11	42 \pm 3,1 (1,1)	31 \pm 2,1(1,1)
0,22	54 \pm 4,0 *(1,5)	30 \pm 6,3 (1,1)
0,44	56 \pm 3,5 *(1,5)	27 \pm 3,5 (0,9)
0,88	65 \pm 3,1**(1,8)	35 \pm 1,2**(1,3)
1,16	71 \pm 1,2**(1,9)	40 \pm 2,0**(1,4)
Quercetina galactopiranosídeo		
0,02	43 \pm 2,8 (1,2)	-
0,06	44 \pm 4,0 (1,2)	30 \pm 5,6 (1,1)
0,07	48 \pm 3,5 (1,3)	29 \pm 2,8 (1,0)
0,10	46 \pm 6,4 (1,2)	30 \pm 2,8 (1,1)
Amentoflavona		
0,28	62 \pm 3,4* (1,7)	49 \pm 2,8** (1,8)
0,56	99 \pm 12,5** (2,7)	61 \pm 0,7** (2,2)
0,84	133 \pm 10,4** (3,6)	62 \pm 1,4** (2,2)
1,12	70 \pm 1,7** (1,9)	77 \pm 12,7** (2,8)
Controle positivo	1023 \pm 41,3	2552 \pm 70,0

Controle positivo: Controle + \rightarrow -S9: 4-nitro-*o*-fenilenodiamina (5 μ g/placa); +S9 \rightarrow 2-antramine (0,125 μ g/placa). * $P < 0,05$ (ANOVA) ** $P < 0,01$ (ANOVA). Os valores em parênteses=razões de mutagenicidade.

Tabela 4: Atividade mutagênica dos extratos de *Byrsonima intermedia* A.Juss. em linhagens de *S. typhimurium*, em presença (+S9) e ausência (-S9) de ativação metabólica.

Tratamento (mg/placa)	Revertentes/placa em linhagens de <i>Salmonella typhimurium</i>							
	TA98		TA97a		TA100		TA102	
	- S9	+S9	- S9	+S9	- S9	+S9	- S9	+S9
MeOH								
0	27 ± 2,3	42 ± 3,2	125 ± 3,1	133 ± 1,2	197 ± 3,6	194 ± 1,5	249 ± 42,0	248 ± 12,6
0,19	-	-	117 ± 0,6 (0,9)	129 ± 1,2 (0,9)	-	-	-	-
0,56	-	-	121 ± 0,6 (0,9)	134 ± 2,0 (1,0)	-	-	-	-
0,73	36 ± 4,7 (1,3)	-	125 ± 1,2 (1,0)	133 ± 1,2 (1,0)	162 ± 8,4 (0,8)	194 ± 1,2(1,0)	210 ± 16,5 (0,8)	230 ± 5,3 (0,9)
1,46	40 ± 4,4* (1,5)	52 ± 5,3 (1,3)	123 ± 1,2 (0,9)	-	162 ± 10,2 (0,8)	197 ± 1,2(0,9)	217 ± 31,0 (0,9)	234 ± 13,5 (0,9)
2,93	40 ± 4,4* (1,5)	49 ± 3,6 (1,2)	127 ± 3,1 (1,0)	-	236 ± 11,2*(1,2)	210 ± 1,2(1,1)	239 ± 15,3 (0,9)	239 ± 5,9 (0,9)
5,83	43 ± 1,5* (1,6)	57 ± 7,6 (1,4)	-	133 ± 0,6 (1,0)	238 ± 11,9*(1,2)	215 ± 3,1(1,1)	268 ± 11,5 (1,1)	262 ± 7,5 (1,1)
8,78	44 ± 2,1* (1,6)	59 ± 1,0*(1,4)	-	131 ± 1,2 (0,9)	269 ± 6,7*(1,4)	217 ± 1,2(1,1)	269 ± 26,6(1,1)	261 ± 13,7 (1,1)
11,70	45 ± 4,5* (1,7)	71 ± 7,0*(1,7)	-	-	308 ± 20,7*(1,6)	224 ± 2,0(1,2)	297 ± 8,7 (1,2)	283 ± 4,0 (1,1)
MeOH/H₂O								
0	27 ± 2,3	42 ± 3,2	125 ± 3,1	133 ± 1,2	197 ± 3,6	194 ± 1,5	249 ± 42,0	248 ± 12,6
0,22	-	-	124 ± 2,0 (0,9)	132 ± 1,5 (0,9)	-	-	-	-
0,43	-	-	123 ± 2,9 (0,9)	134 ± 3,2 (1,0)	-	-	-	-
0,84	32 ± 3,5 (1,2)	-	126 ± 0,6 (1,0)	135 ± 2,7 (1,0)	173 ± 9,0 (0,9)	192 ± 1,5(1,0)	187 ± 5,7(0,8)	254 ± 10,0(1,0)
1,28	-	-	123 ± 4,4 (0,9)	136 ± 3,6 (1,0)	-	-	-	-
1,69	30 ± 2,0 (1,1)	52 ± 3,9(1,2)	126 ± 2,1 (1,0)	-	190 ± 10,9 (0,9)	195 ± 1,0(1,0)	196 ± 14,3 (0,8)	252 ± 10,6(1,0)
3,38	31 ± 3,1 (1,2)	54 ± 0,6(1,3)	-	-	198 ± 6,2 (1,0)	194 ± 2,7(1,0)	262 ± 12,7(1,1)	254 ± 10,2(1,0)
6,25	33 ± 4,5 (1,2)	53 ± 1,0(1,3)	-	-	213 ± 7,9 (1,1)	190 ± 1,5(0,9)	263 ± 18,1 (1,1)	257 ± 13,1(1,0)
10,13	33 ± 5,6 (1,2)	54 ± 3,2(1,3)	-	-	210 ± 7,2 (1,1)	197 ± 1,2(1,0)	287 ± 17,4(1,1)	266 ± 7,6(1,1)
13,50	33 ± 4,0 (1,2)	57 ± 2,7(1,4)	-	-	210 ± 2,3 (1,1)	195 ± 1,2(1,0)	299 ± 27,4(1,2)	275 ± 6,1(1,1)
CHCl₃								
0	27 ± 2,3	42 ± 3,2	125 ± 3,1	133 ± 1,2	197 ± 3,6	194 ± 1,5	249 ± 42,0	248 ± 12,6
0,17	-	-	117 ± 1,2 (0,8)	136 ± 1,0 (1,0)	-	-	-	-
0,68	29 ± 4,3 (1,0)	-	120 ± 0,6 (0,9)	131 ± 0,6 (0,9)	183 ± 16,5 (0,9)	189 ± 1,5(0,9)	208 ± 45,9 (0,8)	217 ± 5,1(0,8)
1,02	-	-	123 ± 0,6 (0,9)	137 ± 4,9 (1,1)	-	-	-	-
1,35	27 ± 1,2 (1,0)	46 ± 2,0 (1,1)	127 ± 1,0 (1,0)	127 ± 1,2 (0,9)	193 ± 4,5 (1,0)	187 ± 0,6(0,9)	197 ± 11,9 (0,8)	219 ± 4,3(0,9)
2,70	27 ± 1,2 (1,0)	40 ± 1,5 (0,9)	129 ± 1,7 (1,0)	134 ± 3,1 (1,0)	195 ± 7,8 (1,0)	193 ± 4,6 (0,9)	242 ± 13,0 (1,0)	231 ± 13,1(0,9)
5,40	29 ± 1,2 (1,0)	47 ± 2,1 (1,1)	-	-	221 ± 9,1 (1,2)	197 ± 2,3(1,0)	255 ± 36,1(1,0)	242 ± 4,4(0,9)
8,10	27 ± 4,2 (1,0)	51 ± 4,7 (1,2)	-	-	220 ± 5,3 (1,1)	199 ± 2,7 (1,0)	276 ± 18,6 (1,1)	239 ± 6,8(0,9)
10,80	29 ± 2,3 (1,0)	51 ± 3,0 (1,2)	-	-	221 ± 12,0 (1,2)	196 ± 0,6(1,0)	316 ± 13,8 (1,3)	269 ± 2,7(1,1)
Controle+	612 ± 5,3	815 ± 1,7	812 ± 1,7	914 ± 9,5	909 ± 1,2	790 ± 7,6	1019 ± 3,1	1131 ± 3,6

MeOH (Extrato metanólico); CHCl₃ (Extrato clorofórmico); MeOH/H₂O (Extrato metanol/água); 0=controle negativo (DMSO=100 µl/placa); Controle + → -S9: 4-nitro-*o*-fenilenodiamina (5 µg/placa) para TA98 e TA97a; Azida sódica (1.25 µg/placa) para TA100 e mitomicina (0.5 µg/placa) para TA102. +S9 → 2-antramine (0.125 µg/placa) foi usado em todas as linhagens. **P* < 0.05 (ANOVA). Os valores em parênteses=razões de mutagenidade

4.3. Ensaios de citotoxicidade

Com base nos resultados obtidos nos ensaios de citotoxicidade, as concentrações utilizadas nos ensaios biológicos foram as seguintes: extrato metanólico de *B.crassa* (280 µg/mL), extrato metanol/água (400 µg/mL), extrato clorofórmico (200 µg/mL), fração aquosa (200 µg/mL) e fração acetato (200 µg/mL), extrato metanólico de *B.intermedia* (350 µg/mL), extrato metanol/água (500 µg/mL) e extrato clorofórmico (250 µg/mL).

4.4. Ensaios de Liberação de Óxido Nítrico com extratos e as frações de *B.crassa*

Niedenzu

De acordo com esses resultados obtidos, verificou-se que todos os extratos induziram a liberação de NO em níveis reduzidos e que o extrato metanólico de *B. crassa* foi aquele que estimulou maior liberação de NO pelos macrófagos. Os ensaios para NO também foram realizados com as frações aquosa e acetato de etila desse extrato (Figura 12). Verificou-se que a fração acetato de etila estimulou liberação de NO com significância estatística em relação ao controle negativo. Com relação ao controle positivo (LPS), verificou-se um resultado significativo, próximo a 50% do valor obtido no controle positivo. A fração aquosa induziu a liberação de NO em níveis reduzidos.

4.5 Ensaios de liberação de Óxido Nítrico com extratos de *B.intermedia* A.Juss.

Os resultados obtidos foram avaliados em relação ao controle negativo e positivo. Demonstraram que houve estímulo para a liberação de NO pelos macrófagos em baixos níveis na presença dos extratos de *B. intermedia*. Uma vez que não obtivemos resultados significativos com os extratos dessa espécie, não houve prosseguimento dos experimentos com frações dessa planta,

como foram feitos com *B. crassa*. A Figura 12 mostra os resultados de liberação de NO por macrófagos peritoneais na presença dos extratos de *B. intermedia* A. Juss.

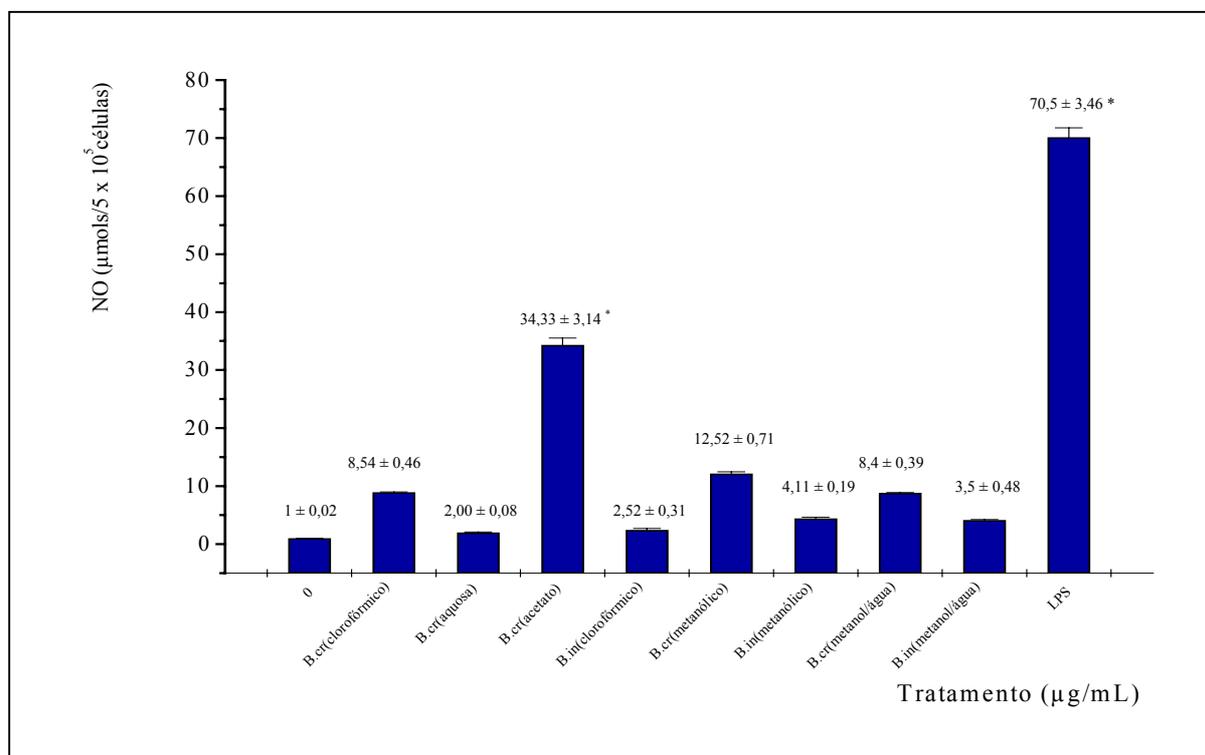


Figura 12. Produção de óxido nítrico (NO) em cultura de macrófagos peritoneais de camundongos na presença dos extratos e frações de *B.crassa* Niedenzu e *B.intermedia* A.Juss. 0 – (controle negativo, apenas células em RPMI-1640); LPS – (controle positivo, lipopolissacarídeo de *E.coli*); B.cr(clorofórmico) – (extrato clorofórmico de *B.crassa*, 200µg/mL); B.cr(aquosa) – (fração aquosa do extrato metanólico de *B.crassa*, 200µg/mL); B.cr(acetato) – (fração acetato de etila do extrato metanólico de *B.crassa*, 200µg/mL); B.in(clorofórmico) – (extrato clorofórmico de *B.intermedia*, 250 µg/mL); B.cr(metanólico) – (extrato metanólico de *B.crassa*, 280 µg/mL); B.in(metanólico) – (extrato metanólico de *B.intermedia*, 340µg/mL); B.cr(metanol/água) – (extrato metanol/água de *B.crassa*, 400 µg/mL); Bin(metanol/água) – (extrato metanol-água de *B.intermedia*, 500µg/mL).

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

4.6. Ensaios de liberação de TNF- α com extratos e frações de *B.crassa* Niedenzu

Os resultados mostram que estes extratos não estimularam a liberação da citocina pelos macrófagos peritoneais.

O ensaio com as frações revelou que a fração acetato de etila estimulou a liberação de TNF- α pelos macrófagos, com significância estatística em relação ao controle negativo. A Figura 13 mostra os resultados da liberação de TNF- α por macrófagos peritoneais na presença dos extratos metanólico, clorofórmico, metanol/água e das frações aquosa e acetato de etila do extrato metanólico de *B.crassa* Niedenzu. Com relação ao controle positivo (LPS), verificou-se um resultado próximo a 10% do valor obtido no controle positivo. Portanto, apesar da fração acetato de etila do extrato metanólico de *B. crassa* estimular a liberação de TNF- α por macrófagos, este estímulo não aconteceu em altos níveis.

4.7. Ensaios de liberação de TNF- α com extratos de *B.intermedia* A.Juss.

A Figura 13 mostra os resultados de liberação de TNF- α por macrófagos peritoneais de camundongos na presença dos extratos de *B.intermedia*. Esses extratos não estimularam a liberação de TNF- α pelos macrófagos, com exceção do extrato metanol/água, que estimulou a liberação da citocina em baixos níveis.

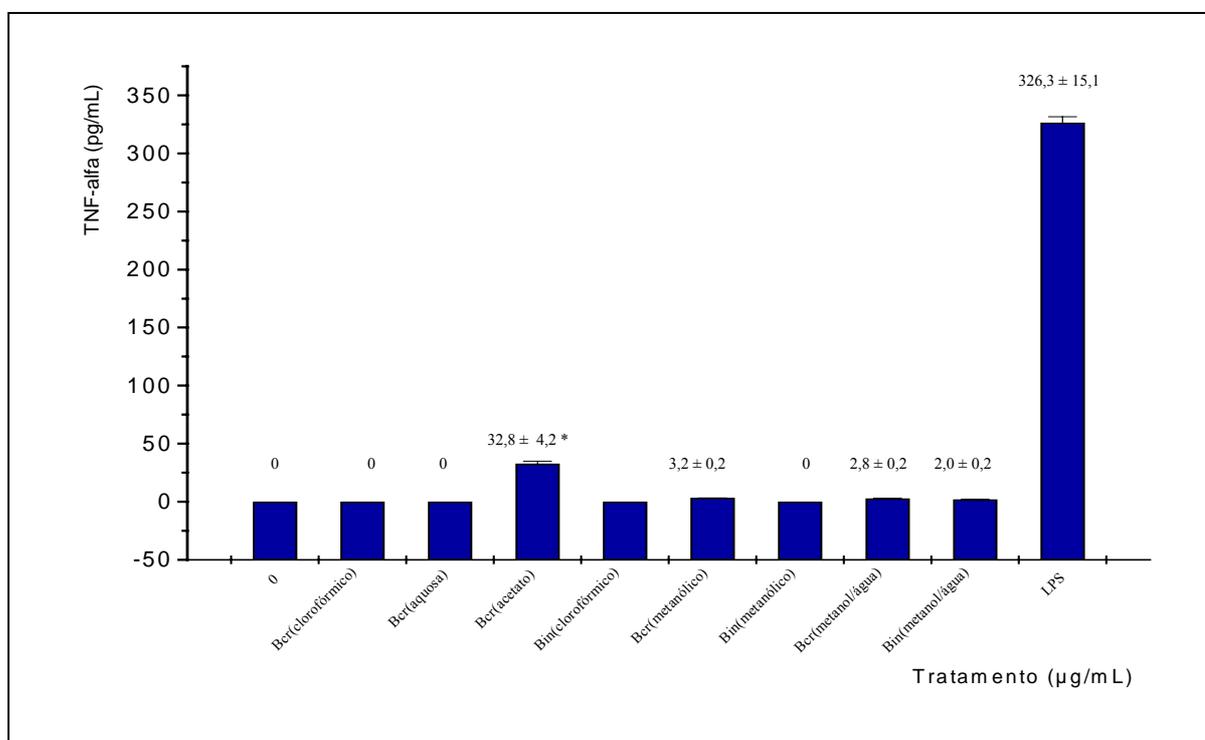


Figura 13. Produção de TNF- α em cultura de macrófagos peritoneais de camundongos na presença de extratos e frações de *B.crassa* Niedenzu e *B.intermedia* A.Juss. 0- (controle negativo, apenas células em RPMI-1640); LPS – (controle positivo, lipopolissacarídeo de *E.coli*); B.cr(clorofórmico) – (extrato clorofórmico de *B.crassa*, 200µg/mL); B.cr(aquosa) – (fração aquosa do extrato metanólico de *B.crassa*, 200µg/mL); B.cr(acetato) – (fração acetato de etila do extrato metanólico de *B.crassa*, 200µg/mL); B.in(clorofórmico) – (extrato clorofórmico de *B.intermedia*, 250 µg/mL); B.cr(metanólico) – (extrato metanólico de *B.crassa*, 280 µg/mL); B.in(metanólico) – (extrato metanólico de *B.intermedia*, 340µg/mL); B.cr(metanol/água) – (extrato metanol/água de *B.crassa*, 400 µg/mL); B.in(metanol/água) – (extrato metanol-água de *B.intermedia*, 500µg/mL).

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

V. DISCUSSÃO

Existe uma grande tendência mundial quanto ao uso de medicamentos de origem vegetal. Estima-se que cerca de um terço da população adulta do mundo Ocidental utilize terapias alternativas, incluindo plantas medicinais. Essas plantas podem ser utilizadas tanto em sua forma primária como em misturas. Ao contrário das drogas sintéticas, as drogas de origem vegetal têm, às vezes, se destacado por serem não tóxicas, possuírem origem natural e serem usadas há muito tempo na medicina popular (ZHOU et al., 2004). Em geral, plantas medicinais contêm inúmeras classes de compostos químicos com propriedades antimutagênicas, antioxidantes, anticarcinogênicas e imunomodulatórias, caracterizando o potencial farmacológico das mesmas no tratamento de muitas doenças, como infecções, desordens imunológicas e câncer (LOPES et al., 2004). De maneira surpreendente, compostos naturais são empregados na terapia alternativa inclusive em desordens mentais, imunossupressão e epilepsias (PUNTUREE et al., 2004). Além disso, é importante ressaltar que a descoberta e o desenvolvimento de um novo fármaco sintético envolvem investimentos altos, enquanto os custos de pesquisa de um novo fitoterápico são bem menores (YUNES et al., 2001).

Espécies do gênero *Byrsonima* (Malpighiaceae) estão amplamente distribuídas ao longo da América Tropical. Essas plantas são conhecidas por suas utilidades populares e tradicionais. As folhas geralmente são utilizadas na forma de infusões para o tratamento de úlceras, como diuréticos e para outras enfermidades (BRITO et al., 2003).

Nesse trabalho, foram realizados estudos biológicos com duas espécies do gênero *Byrsonima*. A primeira, *Byrsonima crassa* Niedenzu (IK), é nativa do Brasil e conhecida popularmente como “murici cascudo” ou “murici vermelho” (SILVA et al., 2001). A outra,

Byrsonima intermedia A.Juss., é conhecida como “murici amarelo” e é amplamente distribuída na América Latina (SANNOMIYA et al., 2004).

O principal objetivo desse trabalho foi a pesquisa de novas moléculas farmacologicamente ativas, considerando-se suas atividades mutagênica e ativadora do sistema imunológico, já que estes parâmetros são importantes na avaliação do “risco e benefício” do uso das mesmas, mesmo na medicina popular. É importante lembrar que muitos compostos presentes nas plantas podem também ser bio-ativados e causar efeitos adversos (JIMÉNÉZ et al., 2005).

De uma maneira geral, o uso popular de muitas plantas orienta os estudos para a caracterização de novas drogas vegetais, favorecendo também bons resultados nas pesquisas realizadas. Atualmente, os estudos etnofarmacológicos sobre uso popular orientam o isolamento de grande parte dos compostos naturais primários utilizados na indústria farmacêutica (YUNES e CALIXTO, 2001).

Os estudos fitoquímicos do *B. crassa* e *B.intermedia* foram realizados no Laboratório de Fitoquímica do Departamento de Química Orgânica da UNESP de Araraquara, pela Dr^a Miriam Sannomiya e colaboradores, sob a orientação do Prof^o Dr. Wagner Vilegas. A investigação fitoquímica do gênero *Byrsonima*, ao longo do tempo, tem revelado a presença de esteróides, triterpenos, ésteres aromáticos, aminoácidos, proantocianidinas, flavonóides e catequinas (BONZANI, 1970; AMARQUAYE et al., 1994; BEJAR et al., 1995; GEISS, 1995; RASTRELLI et al., 1997; MENDES et al., 1999). A análise fitoquímica das frações do extrato metanólico das folhas de *Byrsonima crassa* revelou a presença de taninos e catequinas na fração aquosa, os quais têm apresentado resultados significativos em estudos realizados com camundongos na avaliação de disfunções gástricas e diarreias. Na fração acetato de etila, além da presença de flavonóides, foram isolados os seguintes compostos: amentoflavona, quercetina-3-*O*- α -L-arabinopiranosídeo, quercetina-3-*O*- β -D-galactopiranosídeo (SANNOMIYA et al., 2004). Derivados fenólicos, como

ácido gálico e galato de metila, foram isolados em quantidades significativas, sendo comuns ao gênero, uma vez que também foram isolados de *Byrsonima fagifolia*, espécie cujo perfil fitoquímico está sendo definido no momento. Segundo os autores, esses compostos fenólicos têm despertado grande interesse em pesquisadores na Europa, principalmente na Itália, onde alguns estudos em andamento têm demonstrado importante atividade contra o vírus da Imunodeficiência Humana (HIV). Alguns desses compostos são comuns ao extrato metanólico de *Byrsonima intermedia*, em diferentes proporções. Estudos simultâneos com outros gêneros encontrados no cerrado brasileiro, como por exemplo o gênero *Alchornea*, revelaram a presença de compostos como ácido gálico, galato de etila e quercetina ligada a diferentes unidades de açúcar (URREA-BULLA et al., 2004), além de galato de metila e amentoflavona (BRACA et al., 2002), o que indica que estes compostos são comuns a muitos gêneros pertencentes à flora da região.

Uma vez que o objetivo majoritário das pesquisas esteja voltado para a descoberta de novas moléculas farmacologicamente ativas, é importante que os estudos fitoquímicos sejam guiados por ensaios biológicos, *in vitro* e *in vivo*, favorecendo a descoberta de protótipos de novos fármacos e estabelecendo parâmetros que precederão os ensaios pré-clínicos e clínicos (YUNES e CALIXTO, 2001). E ainda existem muitos compostos naturais a serem estudados (CANNELL, 1998).

Em nosso trabalho, inicialmente, foram analisados os extratos metanólicos, clorofórmicos e hidroalcoólicos (metanol-água 80:20) de *B. crassa* e *B. intermedia*. O perfil da atividade mutagênica direcionou os estudos para o extrato metanólico dessas plantas, já que os demais extratos não apresentaram resultados significativos, exceto o extrato hidroalcoólico, que apresentou indícios de mutagenicidade. Segundo a literatura, o metanol parece ser realmente um dos melhores solventes empregados na obtenção de extratos de plantas, por extrair maior quantidade de compostos (CALIXTO et al., 2004). Além disso, outros estudos biológicos

realizados simultaneamente por grupos de pesquisa pertencentes ao Projeto Biota também obtiveram resultados mais promissores com os extratos metanólico dessas espécies. Foram realizados ensaios de mutagenicidade com as frações e compostos isolados do extrato metanólico de *B.crassa*, uma vez que os ensaios com compostos puros apresentam resultados que definem mais adequadamente o potencial mutagênico (CHANDA et al., 2004). Além disso, esses compostos são comuns ao extrato metanólico de *B.intermedia*. Embora os ensaios imunológicos tivessem apresentado resultados negativos com os extratos, prosseguimos os ensaios com as frações aquosa e acetato de etila do extrato metanólico de *B.crassa*, acompanhando os ensaios de mutagenicidade.

Para os ensaios de mutagenicidade *in vitro*, escolhemos o teste de Ames, pois é uma metodologia relativamente rápida e de alta reprodutibilidade para detectar substâncias genotóxicas, sendo validado por diversos laboratórios (MORTELMANS & ZEIGER, 2000; RIBEIRO et al., 2004; VARELLA et al., 2004). 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).

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 compostos isolados foram solubilizados nesse solvente, e seria importante avaliar se o mesmo não estaria interferindo na promoção da mutação reversa, favorecendo “falsos positivos” com os extratos e demais compostos testados. As concentrações testadas variaram

entre 0,17-33,5mg/placa para os extratos, 0,42-8,82mg/placa para as frações e 0,02-1,16mg/placa para os compostos isolados.

Os resultados positivos foram caracterizados no extrato metanólico de *B.crassa* com a linhagem TA98, que induziu significativo aumento da frequência de revertentes por placa, na ausência de ativação metabólica. Após a adição da fração S9 ao experimento, obtivemos indícios de mutagenicidade com TA98. Na linhagem TA100, obtivemos também indícios de mutagenicidade (-S9). O extrato metanol-água TA98 (-S9) também apresentou apenas indícios de mutagenicidade. A redução da atividade mutagênica desse extrato, comparada com a do extrato metanólico, pode ter sido causada pela adição de água, que provavelmente reduziu a quantidade de compostos mutagênicos extraídos. A fração acetato de etila do extrato metanólico de *B.crassa* (-S9) apresentou indícios de mutagenicidade em todas as concentrações testadas, resultados esses que também despertaram o interesse na continuidade dos estudos com os compostos isolados a partir dessa fração.

A fração aquosa do extrato metanólico de *B.crassa* apresentou resultados negativos para os ensaios de mutagenicidade. Os taninos e catequinas foram os principais compostos presentes nessa fração. Segundo a literatura, esses compostos apresentaram atividades antimutagênicas (HUANG et al., 1985; WISEMAN et al., 1997; KAUR et al., 2000).

Os extratos de *B.intermedia* apresentaram resultados bastante parecidos com extratos de *B.crassa*, embora o extrato metanólico tenha apresentado apenas indícios de mutagenicidade com a linhagem TA98(-S9, +S9) e TA 100 (-S9). Esses resultados eram esperados, uma vez que os estudos fitoquímicos realizados paralelamente ao nosso trabalho revelavam grande similaridade na composição química das duas espécies, com muitos compostos comuns ao gênero *Byrsonima* (RODRIGUES et al., 2004). A diferença de atividade mutagênica entre as duas espécies pode ser explicada pela quantidade de compostos isolados em cada uma delas, os quais provavelmente são

os responsáveis pela atividade mutagênica. Na maioria das vezes, o potencial mutagênico é mais evidente nas espécies vegetais em que os mutágenos estão presentes em maiores concentrações, uma vez que os extratos são misturas complexas, com grande número de compostos químicos diferentes (CHUNG et al., 2005).

Realizamos os ensaios de mutagenicidade com os compostos isolados presentes no extrato metanólico de *B.crassa* para caracterizarmos o potencial mutagênico de cada um deles e em especial, os derivados da quercetina, uma vez que, segundo a literatura, a quercetina e outros flavonóides podem causar mutações tipo *frameshift* por ação direta nas moléculas de DNA. Ferreira & Vargas (1999) verificaram que os extratos de algumas plantas usadas na medicina popular do sul do Brasil apresentaram atividade mutagênica, uma vez que estes contêm principalmente flavonóides, além de outras substâncias. A quercetina tem sido objeto de numerosos estudos de toxicidade genética e carcinogenicidade, envolvendo diversas atividades, como mutações reversas, alterações de cromátides irmãs, aberrações cromossômicas e micronúcleos (GASPAR et al., 1994). As propriedades mutagênicas da quercetina e outros flavonóides têm sido relatadas em muitos testes de mutagenicidade com bactérias e mamíferos (RIETJENS et al., 2005). Segundo Okamoto (2005), a quercetina é um dos flavonóides mais encontrados em vegetais e em frutas, sendo consumida na dieta diária. Os primeiros relatos de suas características mutagênicas ocorreram em 1970. Divergências entre estudos de carcinogenicidade da quercetina realizados *in vivo*, a partir de então, estabeleceram que seu uso suplementar deveria ser avaliado quanto aos riscos e benefícios após severas triagens clínicas, afim de garantir a segurança da saúde humana durante seu uso. Mas é importante salientar que a quercetina apresentou significativo potencial mutagênico em ensaios *in vitro*, principalmente pelo teste de Ames.

Realizamos nesse trabalho os ensaios de mutagenicidade com os compostos isolados do extrato metanólico de *B.crassa*, utilizando a linhagem TA98, com e sem ativação metabólica, já que nela obtivemos a maioria dos resultados significativos. Esses ensaios foram realizados por alguns motivos importantes, entre eles: a) para comprovarmos os relatos da literatura, com estudos próprios, sobre as atividades mutagênicas da quercetina pura e avaliarmos a mesma atividade com os derivados que foram isolados no gênero *Byrsonima*; b) avaliar o potencial mutagênico de derivados fenólicos puros, como o galato de metila, uma vez que este composto tem se mostrado muito promissor em estudos relacionados com o tratamento de enfermidades, como a AIDS; c) verificar qual seria o potencial mutagênico da amentoflavona, um composto que também foi isolado na fração acetato de etila dos extratos metanólicos dessas espécies.

Os resultados obtidos com os compostos isolados foram bastante interessantes, uma vez que refletiram os resultados que obtivemos com os extratos metanólicos das espécies, assim como as frações acetato de etila e aquosa do extrato metanólico de *Byrsonima crassa*. Além disso, nos direcionaram para o composto isolado que provavelmente é o principal responsável pelo potencial mutagênico dos extratos metanólicos. A catequina isolada nas espécies não apresentou atividade mutagênica significativa. A atividade mutagênica da quercetina foi avaliada utilizando-se quercetina pura (Sigma), nas concentrações variando entre 0,05-0,5 mg/placa, com linhagem de *S. typhimurium* de interesse (TA98). Os resultados positivos obtidos evidenciaram seu potencial mutagênico *in vitro*, com e sem ativação metabólica. Os derivados glicosilados quercetina-3-*O*- α -L-arabinopiranosídeo e quercetina-3-*O*- β -D-galactopiranosídeo foram testados em pequenas quantidades disponíveis, com concentrações variando de 0,02-1,16 mg/placa. Apresentaram uma tendência à mutagenicidade dependente da concentração. A maior concentração testada de quercetina-3-*O*- α -L-arabinopiranosídeo (1,16mg/placa) apresentou indícios de mutagenicidade. Comparando-se a atividade mutagênica da molécula primária da quercetina com seus derivados

glicosilados, verificamos marcante redução do potencial mutagênico em algumas concentrações próximas. A quercetina é um mutágeno primário, que se liga diretamente ao DNA (OKAMOTO et al, 2005). Provavelmente, as moléculas de açúcar ligadas à estrutura primária da quercetina reduzem a sua capacidade de interagir com o DNA por alterações conformacionais, restrição de sítio de ligação, entre outros processos. Segundo estudos de Rietjens et al. (2005), modificações na molécula primária da quercetina, em diferentes pontos da molécula, promovem alterações, em diferentes níveis, em seu potencial mutagênico. Verificaram também que existem sítios estratégicos, cuja alteração (principalmente pela adição de radicais) reduz drasticamente a atividade mutagênica da quercetina. Um importante sítio avaliado nesse estudo foi o 3OH, onde a substituição da hidroxila por um novo radical (uma molécula de luteonina) anulou completamente o potencial mutagênico da quercetina. Após a avaliação das moléculas de quercetina-3-*O*- α -L-arabinopiranosídeo e quercetina-3-*O*- β -D-galactopiranosídeo, verificamos que as moléculas de açúcar estão ligadas, justamente, no sítio do terceiro carbono da estrutura primária da quercetina, em substituição à hidroxila. Esse fato justificaria a redução significativa do potencial mutagênico desses derivados glicosilados, embora esta não tenha sido anulada, uma vez que existem outros sítios presentes na estrutura primária que também parecem ser responsáveis pelo marcante potencial mutagênico da quercetina.

Uma vez verificado que a atividade mutagênica da quercetina é reduzida quando ligada a diferentes moléculas de açúcar, e a quercetina primária não foi isolada nessas espécies, restava uma dúvida: “Qual substância potencialmente mutagênica estaria causando os efeitos observados nos extratos metanólicos e na fração acetato de etila?” Provavelmente, os derivados glicosilados poderiam estar contribuindo para o potencial mutagênico, mas não completamente, uma vez que verificamos que a resposta mutagênica depende da concentração e que os mesmos foram isolados em pequenas quantidades.

Destacamos ainda a grande importância dos testes realizados com os compostos isolados, pois evidenciamos, dessa forma, que a amentoflavona possui interessante potencial mutagênico, com e sem ativação metabólica, verificado no teste de Ames. De acordo com os estudos de Uddin et al (2004), a amentoflavona e alguns derivados da apigenina têm a capacidade de causar alterações oxidativas e clivagens no DNA, quando se conjugam com íons cúpricos. Verificamos também que, após a metabolização com enzimas microsossomais presentes na mistura S9, o potencial mutagênico da amentoflavona diminuiu. Segundo estudos realizados por Chaudhary & Willet (2006), a própria amentoflavona e outros flavonóides, como a miricetina, apigenina e quercetina, embora apresentem potencial mutagênico significativo comprovado *in vitro*, têm a capacidade de interagir com enzimas hepáticas CYP1, inibindo a capacidade dessas enzimas de transformar substâncias químicas em metabólitos intermediários carcinogênicos.

Analisando todos os resultados dos ensaios de mutagenicidade obtidos nesse trabalho, verificamos que aquelas substâncias que promoveram alterações no DNA o fizeram pelo mecanismo de deslocamento do quadro de leitura do DNA, detectado através da linhagem TA98, principalmente. Os extratos metanólicos de *B.crassa* e *B.intermedia* também apresentaram resultados com significância estatística com a linhagem TA100, sem ativação metabólica. Essa linhagem detecta mutações por substituição de bases no DNA.

No Brasil, o uso de plantas medicinais é bem difundido, principalmente nas áreas rurais, para o tratamento de muitas enfermidades. Estudos enfocando atividades antiinflamatórias, antimicrobianas e antitumorais/citotóxicas de algumas plantas têm sido reportados (HOLETZ et al., 2002; SUYENAGA et al., 2002; SANTOS PIMENTA et al., 2003). As propriedades imunomodulatórias de muitos extratos de plantas têm sido amplamente descritas, especialmente quanto às atividades inibitórias da produção de óxido nítrico e citocinas, como o TNF- α , por macrófagos (RIMBACH et al., 2000; RYU, 2003a; FERREIRA et al., 2003; RYU et al., 2003b).

Por outro lado, existe também uma forte tendência em se estudar drogas vegetais que possam participar da modulação do sistema imunológico, avaliando-se a capacidade que esses compostos podem ter em promover a liberação de mediadores por macrófagos como, por exemplo, o NO, TNF- α , H₂O₂, entre outros. Diferentes classes de substâncias têm sido estudadas quanto ao caráter imunoestimulante (MARQUES, 2002). Nesse caso, é importante lembrar, além do enfoque terapêutico, que muitos compostos podem estimular a liberação de mediadores imunológicos em altos níveis, causando alterações teciduais e vasculares (CHI et al., 2003).

O sistema imunológico é um mecanismo complexo de defesa do organismo. Dessa forma, a pesquisa básica de drogas vegetais com propriedades imunomodulatórias pode ser feita através de ensaios de estimulação da imunidade inespecífica, como por exemplo, a produção de citocinas e outras substâncias pelos macrófagos (WILLIAMS, 2001).

Os macrófagos constituem um dos principais componentes do sistema imunológico. São as primeiras células a serem ativadas para participarem da resposta imune quando o organismo é confrontado por fatores exógenos de diferentes origens (FORMAN & TORRES, 2001). Nesse caso, uma série de eventos celulares e bioquímicos podem ocorrer, incluindo alterações no potencial de membrana e fluxo de íons, rearranjo do citoesqueleto, além da indução de espécies reativas do oxigênio (EROs), destacando-se H₂O₂, ânions superóxido e radicais hidroxila e de nitrogênio (ERNs), destacando-se o NO, além da liberação de citocinas (LUM, BUTT & LO, 2002). Entre essas citocinas, destacam-se o interferon-gama (IFN- γ), fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) e interleucina-1 (IL-1) (RIMBACH et al., 2000; REIS et al., 2001; RYU et al., 2003 a).

A enzima óxido nítrico sintetase (NOS), é responsável pela produção de NO em diferentes locais do organismo, com diversas ações fisiológicas, como contração da musculatura lisa, reatividade plaquetária, neurotransmissão central e periférica e as ações citotóxicas sobre as

células imunológicas (HOBBS et al., 1999). O NO é um importante mediador que pode exercer efeitos benéficos ou prejudiciais, dependendo do contexto fisiológico (CIRINO et al., 2002). Em geral, o processo fisiológico requer uma ativação equilibrada dos macrófagos, com o objetivo de induzir a proteção com a mínima agressão às células do hospedeiro (IGNÁCIO et al., 2001).

O TNF- α é uma citocina com efeitos benéficos e maléficos. Quando liberado pelos macrófagos, induz proteção em nível local, mas pode causar efeitos nocivos quando liberado sistemicamente (PARHAM, 2001). É responsável por muitos exemplos de destruição de células tumorais pelos macrófagos e, em ação conjunta com o INF- γ , destrói tumores suscetíveis (ROITT et al, 1999).

Atualmente, sabe-se que a atividade não regulada de citocinas e outros mediadores imunológicos podem levar ao desenvolvimento de quadros imunopatológicos severos, caracterizados em algumas doenças inflamatórias, como artrite reumatóide, doença inflamatória intestinal, entre outras (PALLADINO et al., 2003).

Uma vez que a produção de TNF- α por macrófagos ativados é importante na indução da síntese de NO pela iNOS, os ensaios envolvendo esses mediadores tornam-se importantes ferramentas na determinação das propriedades imunomodulatórias ou imunoestimulantes de muitos compostos químicos presentes nas plantas (PUNTUREE et al., 2004).

O conhecimento do papel do NO e do TNF- α em estados fisiológicos e fisiopatológicos despertou o interesse no entendimento dos mecanismos de ação de substâncias exógenas na estimulação e/ou modulação da produção desses mediadores, principalmente quando o objetivo é a descoberta de novas moléculas farmacologicamente ativas (ACHIKE & KWAN, 2003).

Nesse trabalho, tivemos como objetivo avaliar o potencial imunoestimulante dos extratos de *B.crassa* e *B.intermedia*, ou seja, a possível ação dos compostos químicos presentes nos extratos dessas plantas na ativação de macrófagos e conseqüente liberação de NO e TNF- α .

Uma importante etapa desse trabalho, que antecedeu os ensaios imunológicos, foram os ensaios de citotoxicidade dos extratos e frações de *B.crassa* e *B.intermedia* com os macrófagos peritoneais murinos. Esses ensaios foram realizados no Laboratório de Microbiologia do Departamento de Análises Clínicas da FCF/UNESP, sob a coordenação da Prof^a Dr^a Maria Stella Gonçalves Raddi. A técnica empregada foi a do Vermelho Neutro (BALBICH & BORENFREUND, 1998), cujo princípio baseia-se na característica do corante supra vital (cloridrato de 3-amino-m-dimetilamino-2-metilfenazina), uma vez que somente células vivas o incorporam por pinocitose ou transporte ativo através da membrana plasmática, acumulando este corante nos lisossomas (MARQUES, 2002). Essa técnica foi escolhida porque substitui o teste colorimétrico MTT, proposto por Mosmann (1983) para a avaliação citotóxica de extratos vegetais, uma vez que estes possuem, geralmente, grande quantidade de substâncias glicosiladas (RIDDEL et al, 1986).

Os ensaios de citotoxicidade também foram realizados com o DMSO, por que os extratos e frações foram inicialmente solubilizados nesse solvente. De acordo com os resultados, as diluições dos extratos e frações em RPMI-1640 não ultrapassaram a um limite de 2 % de DMSO, com a finalidade de evitar interferências nos ensaios imunológicos. Concentrações crescentes de extratos e frações foram testadas, com a finalidade de determinar a maior concentração não tóxica. A determinação da maior concentração não tóxica baseou-se na viabilidade celular, ou seja, uma concentração foi considerada atóxica quando se verificou viabilidade celular acima de 90%. A escolha das concentrações testadas baseou-se em outros trabalhos, em que não se observou citotoxicidade representativa variando-se entre 500 e 100 µg/mL (HU et al., 2003; MEHROTRA, 2003).

Com base nos ensaios de citotoxicidade fornecidos, determinamos as concentrações a serem utilizadas, para cada extrato e fração das plantas, nos ensaios imunológicos. Como o

objetivo desse trabalho era uma triagem da possível atividade imunoestimulante das espécies, realizou-se os ensaios imunológicos apenas com a maior concentração não tóxica.

O método de escolha para a determinação do NO foi o de Griess, por consistir em uma técnica relativamente simples, eficiente e bem documentada (MARQUES, 2002). O princípio do método envolve a degradação oxidativa do NO em solução aquosa, formando nitrito (NO_2^-) que é determinado pelo reagente de Griess, que reage primeiramente com a sulfanilamida (reação de diazotização) em meio ácido, formando um composto intermediário que reage com o naftiletilenodiamino formando um derivdo azo colorido prontamente monitorado em espectroscopia de UV/visível com absorbância máxima de 548 nm e pH 2.0. O meio ácido favorece a reação de diazotização, melhorando o rendimento na leitura espectrofotométrica (MALINSKI, 1996). O controle positivo escolhido foi o lipopolissacarídeo de *E.coli* sorotipo 0111: B4 (LPS) por que essa molécula induz o aumento da capacidade funcional das células imunológicas, favorecendo respostas fisiopatológicas em infecções causadas por bactérias Gram-negativas e inflamações generalizadas (LANGHANS, 1996). Os macrófagos podem reconhecer pequenas quantidades de LPS no ambiente, caracterizando essa molécula como um potente estimulador imunológico (ZWILLING & EISENSTEIN, 1994).

A metodologia utilizada para a determinação de $\text{TNF-}\alpha$ foi a que se baseia na propriedade que tem esse mediador de lisar certas linhagens de células tumorais (CARSWELL et al., 1975; CARLOS et al., 1994). Esta metodologia foi padronizada no Laboratório de Imunologia da FCF/UNESP para a linhagem tumoral L929 (fibrosarcoma murino).

Os estudos fitoquímicos realizados no laboratório de Fitoquímica do IQ/UNESP (item 3.2.) demonstraram que esses extratos consistem em misturas bastante complexas de substâncias químicas. Verificamos que todos os extratos de *B.crassa* e *B.intermedia* estimularam a liberação de NO em baixos níveis. O extrato que promoveu maior ativação de macrófagos e liberação de

NO foi o extrato metanólico. Por esse motivo, direcionamos os ensaios imunológicos para as frações acetato de etila e aquosa desse extrato. Os ensaios de liberação de TNF- α também foram pouco significativos em relação ao controle negativo e também quanto ao controle positivo, no qual os macrófagos foram estimulados com LPS, com todos os extratos dessas espécies.

Os resultados obtidos com a fração aquosa foram negativos para NO e TNF- α . A constituição química dessa fração consiste, principalmente, em catequinas e taninos que, segundo a literatura, são compostos com atividade imunomoduladora conhecida. A geração de radicais de oxigênio em monócitos é inibida pela catequina (MIDDLETON JR, 2000; SOLIMAN, 1998).

A fração acetato de etila, contrariamente, apresentou resultados significativos em relação ao controle negativo, para NO e TNF- α . Em relação ao controle positivo, o resultado foi significativo para a liberação de NO, cujo valor foi próximo àquele liberado pelos macrófagos em presença do LPS. A constituição química dessa fração consiste, basicamente, de quercetinas glicosiladas (quercetina-3-O- β -D-galactopiranosídeo e quercetina-3-O- α -L-arabinopiranosídeo), uma mistura de (+)-catequina e (-)-epicatequina, ácido gálico, galato de metila e amentoflavona (SANNOMIYA et al., 2004).

Os flavonóides são compostos fenólicos que ocorrem naturalmente nas plantas. Alguns deles possuem atividade imunomodulatória conhecida (BALDWIN JR, 2000). Vários estudos comprovam a ação inibitória dos flavonóides sobre a produção de NO e TNF- α por macrófagos. Por exemplo, o resveratrol, presente no vinho tinto, mostrou forte efeito inibitório na expressão de iNOS e geração de NO por macrófagos ativados (TSAI et al., 1999); a quercetina mostrou atividade inibitória na superprodução de NO e TNF- α em macrófagos (MANJEET et al., 1999); muitos outros flavonóides presentes na dieta já foram estudados, como a morina, apigenina, ácido elágico, ácido cafeico e curcumina, e todas essas substâncias apresentaram efeitos supressores dose-dependente sobre a produção de NO (SOLIMAN, 1998; FANG et al, 2003). Muitas

substâncias fenólicas presentes em plantas medicinais possuem ação antiinflamatória e antioxidante, propriedades estas que se relacionam com os mecanismos de quimioprevenção sobre a carcinogênese (SURH et al., 2001). A amentoflavona é um biflavonóide com atividades antifúngicas e antiinflamatórias, que atua por alguns mecanismos, como supressão do gene de expressão da iNOS, modulação da síntese de prostaglandinas, inibição de COX-2, inibição do fator de transcrição nuclear NF- κ B, que é importante na expressão de muitos genes relacionados com a inflamação, entre outros (BUCAR et al, 1998; KIM et al., 1998; ZIBOH et al., 2002; WOO et al., 2005). A inibição de TNF- α relacionada à amentoflavona também foi relatada em estudos de Banerjee et al (2002).

Frente aos estudos citados acima, sugerimos os resultados negativos para a atividade imunoestimulante encontrados nos extratos metanólicos de *B.crassa* e *B.intermedia*, além da fração aquosa de *B.crassa*, embora essa propriedade deva ser avaliada através de ensaios de inibição da liberação desses moduladores por macrófagos na presença desses compostos. Apenas os ensaios de liberação de NO e TNF- α não são suficientes para a caracterização da atividade antiinflamatória de um composto.

Contrariamente, a fração acetato de etila apresentou uma atividade ativadora de macrófagos quanto à produção de NO e TNF- α , apesar de estarem presentes nessa fração substâncias descritas como sendo inibitórias na produção desses mediadores. A atividade imunomodulatória dos compostos presentes nessa fração é bem documentada, quando testados isoladamente. Frente aos resultados obtidos nos ensaios imunológicos com a fração acetato, e considerando que as matérias primas vegetais são misturas complexas cujas moléculas interagem quimicamente entre si e com o organismo, podemos dizer que, provavelmente, a interação entre essas moléculas, nessa fração, poderia estar promovendo uma “nova ação farmacológica”, a qual não acontece quando cada substância isolada é testada separadamente. Outro aspecto importante

a ser considerado é que o fracionamento de uma mistura complexa concentra determinados constituintes em cada uma das frações, de acordo com a metodologia de extração utilizada (YUNES & CALIXTO, 2001). Portanto, podemos dizer que a concentração proporcional das substâncias puras é maior na fração acetato de etila do que no extrato metanólico bruto, o que poderia favorecer interações químicas entre essas moléculas ou ações sinérgicas com características diferenciadas daquelas observadas no extrato inicial.

Analisando os resultados obtidos nos ensaios imunológicos, pergunta-se: -“Teriam os compostos isolados de plantas as mesmas propriedades imunomodulatórias das preparações obtidas da planta inteira, dos extratos brutos ou das frações com misturas de alguns compostos (WILLIAMS, 2001)”? Para responder essa questão, seriam importantes os ensaios imunológicos com os compostos isolados e com a mistura dos mesmos, na mesma proporção da fração acetato, com a finalidade de avaliarmos a possível interação química e a reprodutibilidade dos resultados obtidos anteriormente. Esses ensaios não foram realizados nesse trabalho, uma vez que não estavam disponíveis quantidades suficientes das substâncias puras, porém o direcionamento dos experimentos nesse sentido representa uma interessante proposta para estudos biológicos futuros. Além disso, a determinação de outras citocinas relacionadas ao processo inflamatório, como o IFN- γ , pode auxiliar na elucidação dos resultados obtidos nesse trabalho.

Apesar da fração acetato de etila ser responsável pela promoção de uma ação imunoestimulante significativa, verificamos que a liberação de NO e TNF- α pelos macrófagos não alcançou o nível considerado excessivo em nosso trabalho, ou seja, esteve abaixo de 50% da atividade observada no controle positivo. Este resultado é interessante, uma vez que altas concentrações desses mediadores são prejudiciais ao organismo, tornando-se citotóxicas para as células adjacentes.

Embora os estudos com plantas medicinais sejam recentes, as matérias primas vegetais constituem uma rica fonte de novas moléculas farmacologicamente ativas (WILLIANS, 2001). Embora o sinergismo farmacológico de uma mistura complexa de compostos seja uma vantagem, justificando o uso dos fitoterápicos (GOEPEL et al., 1999; YUNES et al., 2001), destacamos a importância dos ensaios de mutagenicidade com os compostos isolados a partir da fração acetato de etila do extrato metanólico de *B.crassa*, uma vez que os resultados nos direcionaram para a substância possivelmente responsável por esses efeitos. Em relação aos estudos para novas moléculas ativas, destacamos a ação mutagênica da amentoflavona e a importância da avaliação do risco e benefício na utilização desse composto em outras atividades biológicas. Sob o aspecto imunológico, os resultados obtidos nesse trabalho foram muito importantes, uma vez que os extratos não estimularam a liberação de NO e TNF- α e abriram perspectivas para estudos farmacológicos futuros de novos fitoterápicos imunoestimulantes e imunomoduladores e ofereceram uma contribuição para consolidar uma base científica para o uso popular dessas plantas.

VI. CONCLUSÕES

Através dos resultados obtidos no presente trabalho, pode-se concluir que:

- Os extratos clorofórmicos de *B.crassa* e *B.intermedia* não apresentaram atividade mutagênica.

- Os extratos hidroalcoólicos de *B.crassa* e *B.intermedia* apresentaram indícios de mutagenicidade; comparando-se com os resultados dos extratos metanólicos, sugerimos que a adição de água e conseqüente diluição reduziu o potencial mutagênico;

- O extrato metanólico de *B.crassa* apresentou atividade mutagênica na linhagem TA98.

A fração acetato de etila apresentou fortes indícios de mutagenicidade

-Dos compostos que foram isolados somente a amentoflavona apresentou mutagenicidade positiva, podendo ser considerada uma das responsáveis pelo efeito genotóxico. O derivado quercetina-3-O- α -L-arabinopiranosídeo apresentou indícios de mutagenicidade . A adição de açúcar na molécula da quercetina diminuiu drasticamente sua mutagenicidade.

- A fração aquosa do extrato metanólico de *B.crassa* não apresentou atividade mutagênica e em sua constituição química foram detectados taninos e catequinas

- Os extratos de *B.crassa* e *B.intermedia* induziram a liberação de NO e TNF- α por macrófagos peritoneais murinos em níveis reduzidos;

- A fração aquosa do extrato metanólico de *B.crassa* não induziu a liberação de NO e TNF- α ;

- A fração acetato de etila do extrato metanólico de *B.crassa* induziu liberação de NO em altos níveis, ou seja, com valor próximo a 50% do controle positivo. Para TNF- α , houve indução que, se relacionada com o controle positivo, não foi em altos níveis.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHIKE, F.I.; KWAN, C.Y.; Nitric oxide, human diseases and the herbal products that affect the nitric oxide signaling pathway. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.**, vol. 30, p. 605-615, 2003.

AMARQUAYE, A.; CHE, C.T.; BEJAR, E.; MALONE, M.H.; FONG, H.H.S.; A New Glycolipid from *Byrsonima crassifolia*. **Planta Med.**, vol. 60, p. 85, 1994.

AMES, B.N. Dietary carcinogens and anticarcinogens. Oxygen radicals and degenerative diseases. **Science**, vol. 221, n. 4617, p. 1256-1264, 1983.

BALBICH, H.; BORENFREUND, E.; MARTIN-ALGUACIL, N.; Comparisons of two *in vitro* cytotoxicity assays – The neutral red (NR) and tetrazolium MTT tests. **Toxicol. In vitro**, vol. 2, p. 1-6, 1998.

BALDWIN, J.; Inhibition of NF- κ B sensitizes non-small cells to chemotherapy induced apoptosis. **The Ann. Thor. Surg.**, vol. 70, p. 930-936, 2000.

BANERJEE, T.; VALACCHI, G.; ZIBOH, V.A.; VLIET, A.; Inhibition of TNF-alpha-induced cyclooxygenase-2 expression by amentoflavone through suppression of NF-kappa B activation in A549 cells. **Molec. and Cel. Biochem.**, vol. 238, n. 1-2, p. 105-110, 2002.

BEJAR, E.; AMARQUAYE, A.; CHE, C.T.; MALONE, M.H.; FONG, H.H.S.; Constituents of *Byrsonima crassifolia* and their spasmogenic activity. **Int. J. Pharmacogn.**, vol. 33, p. 25, 1995.

BONZANI, J.; β -Amyrin in roots of *Byrsonima intermedia*. **Ver. Farm. Bioquim. Univ. São Paulo**, vol. 8, n. 1, p. 53-67, 1970.

BORENFREUND, E.; PUERNER, J.A.; Toxicity determined *in vitro* by morphological alterations and neutral red absorption. **Toxicol. Letters**, vol. 24, p. 119-124, 1985.

BRACA, A.; MENDEZ, J.; MENICHINI, F.; MORELLI, I.; Constituents of *Alchornea triplinervia* (Euphorbiaceae). **Biochem. Sistem. Ecol.**, vol. 30, p. 1109-1111, 2002.

BRITO, A.R.M.; SANNOMIYA, M.; VILEGAS, W.; Estudo químico preliminar do extrato polar de *Byrsonima crassa* (Malpighiaceae). **Resumo apresentado à Sociedade latino-Americana de Etnomedicina**, 2003.

BUCAR, F.; JACAK, S.M.; NOREEN, Y.; KARTNIG, T.; PEREIRA, P.; BOHLIN, L.; ZSILAVECZ, M.; Amentoflavone from *Biophytum sensitivum* and its effect on COX-1/COX-2 catalysed prostaglandin biosynthesis. **Planta Med.**, vol. 64, n. 4, p. 373-374, 1998.

BURGER, R.A.; TORRES, A.R.; WARREN, R.P.; CALDWELL, V.D.; HUGLES, B.G.; Echinacea induced cytokine production by human macrophages. **Int.J. Immunopharmacol.**, vol. 19, p. 371-379, 1997.

CALIXTO, J.B.; CAMPOS, M.M.; OTUKI, M.F.; SANTOS, A.R.S.; Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part II. Modulation of pro-inflammatory cytokines, chemokines, adhesion molecules. **Plant. Med.**, vol. 70, p. 93-103, 2004.

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

CARLOS, I.Z.; ZINNI, M.M.C.; SGARBI, D.B.G.; ANGLUSTER, J.; ALVIANO, C.S.; SILVA, C.L.; Disturbances in the production of interleukin-1- necrosis and tumor factor in dissiminated murine sporothricosis. **Mycophatology**, vol. 127, p. 189-194, 1994.

CARSWELL, E.A.; KASSEL, R.L.; GREEN, S.; FIORE, N.; WILLIAMSON, B.; An endotoxin induced serum factor that causes necrosis of tumors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, vol. 72, p. 3666-3670, 1975.

CHANDA, S.; EREXSON, G.; INNES, D.; STEVENSON, F.; MURLL, H.; BLEY, K.; Genotoxicity studies with pure *trans*-capsaicin. **Mut. Res./Gen.Toxicol. and Env.Mut.**, vol. 557, p. 85-97, 2004.

CHAUDHARY, A.; WILLETT, K.L.; Inhibition of human cytochrome CYP1 enzymes by flavonoids of St. John's wort. **Toxicol.**, vol. 217, p. 194-205, 2006.

CHI, D.S.; QUI, M.; KRISHNASWAMY, G.; LI, C.; STONE, W.; Regulation of nitric oxide production from macrophages by lipopolysaccharide and catecholamines. **Nitric Oxide: Biol. Chem.**, vol. 8, p. 127-132, 2003.

CHOI, E.; HUANG, J.K.; Screening of Indonesian medicinal plants for inhibitor activity on nitric oxide production of RAW264.7 cells and antioxidant activity. **Fitoterapia**, vol. 76, p. 194-203, 2005.

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.**, vol. 43, p. 247-252, 2005.

CIRINO, G.; SANTAGADA, V.; CALIENDO, G.; The nitric oxide related therapeutic phenomenon : a challenging task. **Curr. Pharm. Des.**, vol. 8, n. 3, p. 233-239, 2002.

DAVID, J.M.; SANTOS, F.A.; Flavonóide e triterpenos de *Stigmaphyllon paralias*. **Quim.Nova**, vol. 26, n.4, p. 484-487, 2003.

DUSSE, L.M.S.; VIEIRA, L.M.; CARVALHO, M.G.; Nitric oxide revision. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, vol. 39, n. 4, p. 343-350, 2003.

EIGLER, A.; SINHA, B.; HARTMANN, G.; ENDRES, S.; Taming TNF: strategies to restrain this proinflammatory cytokine. **Immunol. Today**, vol. 18, n. 10, p. 487-492, 1997.

FANG, S.H.; HOU, Y.C.; CHANG, W.C.; HSIU, S.L.; CHAO, P.D.L.; CHIANG, B.L.; Morin sulfates/glucuronides exert anti-inflammatory activity on activated macrophages and decreased the incidence of septic shock. **Life Scienc.**, vol. 74, p. 743-756, 2003.

FERREIRA, I.C.D.F.; VARGAS, V.M.F.; Mutagenicity of medicinal plant extracts in *Salmonella*/microsome assay. **Phytot. Res.**, vol.13, n.5, p. 397-400, 1999.

FERREIRA, A.P.; SOARES, G.L.; SALGADO, C.A.; GONÇALVES, L.S.; TEIXEIRA, H.C.; TEIXEIRA, F.M.; KAPLAN, M.A.; Immunomodulatory activity of *Mollugo verticillata* L. **Phytomed.**, vol. 10, p. 154-158, 2003.

FETROW, C.; AVILA, J.R.; Manual de medicina alternativa para o profissional. **Guanabara Koogan**, p. 743, 2000.

FLORA FILHO, R.; ZILBERSTEIN, B.; Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. **Rev. Ass. Méd. Brasil.**, vol. 46, n. 3, p. 265-271, 2000.

FONSECA, V.B.; SANNOMIYA, M.; da SILVA, M.A.; ROCHA, L.R.M.; dos SANTOS, L.C.; HIRUMA-LIMA, C.A.; BRITO, A.R.M.S.; VILEGAS, W.; Flavonoids and antiulcerogenic activity from *Byrsonima crassa* leaves extracts. **J. Ethnopharmacol**, vol. 97, n.1, p. 1-6, 2005.

FORMAN, H. J.; TORRES, M.; Redox signaling in macrophages. **Mol. Aspects Med.**, vol. 22, p.189-216, 2001.

GASPAR, J.; RODRIGUES, A.; LAIRES, A.; SILVA, F.; COSTA, S.; MONTEIRO, M.J.; RUEFF, J.; On the mechanisms of genotoxicity and metabolism of quercetin. **Mutagenesis**, vol. 9, p. 445–449, 1994.

GEISS, F; HEINRICH, M.; HUNKLER, D.; RIMPLER, H.; Proanthocyanidins with (+)-epicatechin units from *Byrsonima crassifolia* bark. **Phytochem.**, vol. 39, p. 635-643, 1995.

GIBSON, P.R.; Increased gut permeability in Crohn's disease: is TNF the link? **Gut**, vol. 53, n. 12, p. 1724-1725, 2004.

GOEPEL, M.; HECKER, U.; KREGE, S.; RUBBEN, H.; MICHEL, M.C.; Saw palmetto extracts potently and noncompetitively inhibit human alpha-1-adrenoceptors *in vitro*. **Prostate**, vol. 38, n. 3, p. 208-215, 1999.

GREEN, L.C.; WAGNER, D.A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P.L.; WISHNOK, J.S.; TANNERNBAUN, S.R.; Analysis of nitrate, nitrite and [¹⁵N] nitrate in biological fluids. **Anal. Biochem.**, vol. 126, p. 131-138, 1982.

HOBBS, A.J.; HIGGS, A.; MONCADA, S.; Inhibition of nitric oxide synthase as a potential therapeutic target. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, vol. 39, p. 191-220, 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**, vol. 97, n. 7, p. 1027-1031, 2002.

HU, C.; ZAWISTOWSKI, J.; LING, W.; KITTS, D.D.; Black Rice (*Oriza sativa* L. *indica*): Pigmented Fraction Suppresses both Reactive Oxygen Species and Nitric Oxide in Chemical and Biological Model Systems. **J. Agric. Food Chem.**, vol. 51, p. 5271-5277, 2003.

HUANG, M. T.; CHANG, R. L.; WOOD, A. W.; NEWMARK, H. L.; SAYER, J. M.; YAGI, Y.; JERINA, D. M.; CONNEY, A. M.; Inhibition of the mutagenicity of the bay region diol epoxides of polycyclic hydrocarbons by tannic acid, hydroxylated anthraquinones and hydroxylated cinnamic acid derivatives. **Carcinogenesis**, vol. 6, p. 237-242, 1985.

IGNÁCIO, S. R. N.; FERREIRA, J. L. P.; ALMEIDA M.B.; KUBELKA C.F.; Nitric oxide production by murine peritoneal macrophages *in vitro* and *in vivo* treated with *Phyllanthus tenellus* extracts. **J. Ethnopharmacol.**, v. 74, p.181-187, 2001

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.**, vol. 585, p.147-155, 2005.

KAUR, S.J.; GROVER, I.S.; KUMAR, S.; Modulatory effects of a tannin fraction isolated from *Terminalia arjuna* on the genotoxicity of mutagens in *Salmonella typhimurium*. **Food Chem. Toxicol.**, vol. 38, p. 1113-1119, 2000.

KIM, H.K.; SON, K.H.; CHANG, H.W.; HANG, S.S.; KIM, H.P.; Amentoflavone, a plant biflavone: A new potential anti-inflammatory agent. **Arch. Pharm. Res.**, vol. 21, n. 4, p. 406-410, 1998.

KUSAMRAN, W.R.; TEPSWAN, A.; KUPRADINUN, P.; Antimutagenic and anticarcinogenic potentials of some Thai Vegetables. **Mut. Res.**, vol.402, p. 247-258, 1998.

LANGHANS, W.; Bacterial products and the control of ingestive behavior: clinical implications. **Nutrition**, vol. 12, n. 5, p. 303-315, 1996.

LOMBELLO, R.A.; MARTINS, E.R.F.; Malpigiaceae: correlations between habit, fruit type and basic chromosome number. **Acta Bot. Bras.**, São Paulo, vol. 17, n.2, 2003.

LOPES, L.C.; ALBANO, F.; LARANJA, G.A.T; ALVES, L.M.; SILVA, L.F.M.; SOUZA, G.P; ARAÚJO, I.M.; NETO, J.M.N.; FELZENSZWALB, I.; KOVARY, K.; Toxicological evaluation by *in vitro* and *in vivo* assays of an aqueous extract prepared from *Echinodorus macrophyllus* leaves. **Toxicology letters**, vol. 116, p. 189-198, 2000.

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.; CALVO, T.R.; VILEGAS, W.; CARLOS, I.Z.; Inhibition of hydrogen peroxide, nitric oxide and TNF-alpha production in peritoneal macrophages by ethyl acetate fraction from *Alchornea glandulosa*. **Biol. and Pharmacol. Bulletin.**, vol. 28, n.9, p. 1726-1730, 2005.

LUM, H.K.; BUT, Y.K.C.; LO, S.C.L.; Hydrogen peroxide induces a rapid production of nitric oxide in mung bean (*Phaseolus aureus*). **Nitric Oxide**, v. 6, p. 205-213, 2002.

MacMICKING, J.; QIAO-WEN XIE; NATHAN, C.; Nitric oxide and macrophage function. **Annu. Rev. Immunol.**, vol. 15, p. 323-350, 1997.

MALINSKI, T.; KUBASZEWSKI, E; KIECHLE, F.; Nitric oxide synthase characterization and functional analysis. **M. D. Maines**, p. 14-33, 1996.

MANJEET, K.R.; GHOSH, B.; Quercetin inhibits LPS-induced nitric oxide and tumor necrosis factor- α production in murine macrophages. **Int. J. Immunopharmacol.**, vol. 21, p. 435-443, 1999.

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

MARQUES, M.F.; Molécula de Óxido Nítrico e a sua inter-relação com o Fator de Necrose Tumoral- α na resposta imunológica induzida por *Styrax camporum Pohl*. **Dissertação de Mestrado**, FCF/Unesp, SP – Brasil, 2002.

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.**, vol. 536, p. 117-120, 2003.

MENDES, C.C.; CRUZ, F.G.; DAVID, J.M.; NASCIMENTO, I.P.; DAVID, J.P.; Triterpenes esterified with fatty acid and triterpene acids isolated from *Byrsonima microphylla*. **Quim. Nova**, vol. 22, p.185, 1999.

METHE, H.; ZIMMER, E.; GRIMM, C.; NABAUER, M.; KOGLIN, J.; Evidence for a role of toll-like receptor 4 in development of chronic allograft rejection after cardiac transplantation. **Transplantation**, vol. 78, n. 9, p. 1324-1331, 2004.

MEHROTRA, S.; MISHRA, K.P.; MAURYA, R.; SRIMAL, R.C.; YADAV, V.S.; PANDEY, R.; SINGH, V.K.; Anticellular and immunosuppressive properties of ethanolic extract of *Acorus calamus* rhizome. **Int. Immunopharmacol.**, vol. 3, p. 53-61, 2003.

MIDDLETON, JR, E.; KANDASWAMI, C.; THEOHARIDES, T.C.; The effects of Plant Flavonoids on Mammalian Cells: Implications for Inflammation, Heart Disease, and Cancer. **Pharmacol. Rev.**, vol. 52, p. 673-751, 2000.

MOILANEN, E.; VAPAATALO, H.; Nitric oxide in inflammation and immune response. **Ann. Med.**, vol. 27, n.3, p.359-367, 1995.

MONTOURO, P.; SANNOMIYA, M.; 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. **Rap. Commun. in Mass Spectr.**, vol. 19, n.16, p. 2244-2250, 2005.

MORTELMANS, K.; ZEIGER, E.; The Ames *Salmonella* mutagenicity assay. **Mut. Res.**, vol. 455, n.1-2, p. 29-60, 2000.

MOSMANN, T.; Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods**, vol. 65, p. 55-63, 1983.

NAKAMURA, Y.K.; SUGANUMA, E.; KUIJAMA, N.; SATO, K.; OHTSUKI, K.; Comparative bio-antimutagenicity of common vegetables and traditional vegetables in Kyoto. **Biosci, Biotech. and Biochem.**, vol. 62, p.1161-65, 1998.

NAPOLITANO, D.R.; MOINEO, J.R.; SOUZA, M.A.; PAULA, J.E.; ESPINDOLA, L.S.; Down-modulation of nitric oxide production in murine macrophages treated with crude plant extracts from the Brazilian Cerrado. **J. Ethnopharmacol.**, vol. 99, p. 37-41, 2005.

NOGUEIRA, M.E.I.; PASSONI, M. H.; BISO, F.I.; LONGO, M.C.; CARDOSO, C.R.P.C.; dos SANTOS, L.C.; VARANDA, E.A.; Investigation of genotoxic and antigenotoxic activities of *Melampodium divaricatum* in *Salmonella typhimurium*. **Toxicol. in vitro**, article in press, 2005.

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

PAE, H.O.; OH, G.S.; CHOI, B.M.; SHIN, S.; CHAI, K.Y.; OH, H.; KIM, J.M.; KIM, H.J.; JANG, S.I.; CHUNG, H.T.; Inhibitory effects of the stem bark of *Catalpa ovata* G. Don. (Bignoniaceae) on the productions of tumor necrosis factor- α and nitric oxide by the lipopolisaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages. **J. Ethnopharm.**, vol. 88, p. 287-291, 2003.

PALLADINO, M.A.; BAHJAT, F.R.; THEODORAKIS, E.; MOLDAWER, L.L.; Anti TNF- α therapies: the next generation. **Rev. Drug Discov.**, vol. 2, p. 736-746, 2003.

PARHAM, P.; O sistema imune. **Artemed**, p. 372, 2001.

PHILLIPSON, J.D.; 50 years of medicinal plant research – every progress in methodology is a progress in science. **Planta Med.**, vol. 69, p. 491-495, 2003.

PIMENTEL GOMES; Fruticultura Brasileira. **Livraria Nobel**, São Paulo, 2005.

PUNTUREE, K.; WILD, C.P.; VINITKETKUMNEUN, U.; Thai medicinal plants modulate nitric oxide and tumor necrosis factor- α in J774.2 mouse macrophages. **J.Etnopharmacol.**, vol. 95, p. 183-189, 2004.

REIS, D.S.; SOUZA, M.A.; MINEO, J.R.; ESPINDOLA, F.S.; Miosyn V and iNOS expression is enhanced in J774 murine macrophages treated with IFN- γ . **Braz. J. Med. Biol. Res.**, vol. 34, p. 221-226, 2001.

RASTRELLI, R.; TOMMASI, N.; BERGER, I.; CACERES, A.; SARAVIA, A.; SIMONE, F., Glycolipids from *Byrsonima crassifolia*. **Phytochem.**, vol. 45, p. 647, 1997.

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.**, vol. 42, p. 969-973, 2004.

RIDDEL, R.J.; CLOTHIER, R.H.; BALLS, M.; An evaluation of three *in vitro* citotoxicity assays. **Food Chem. Toxicol.**, vol. 24, p. 469-471, 1986.

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.**, vol. 574, p. 124-138, 2005.

RIMBACH, G.; PARK, Y.C.; GUO, Q.; MOINI, H.; QURESHI, N.; SALIOU, C.; TAKAYAMA, K.; VIRGILI, F.; PACKER, L.; Nitric oxide synthesis and TNF- α secretion in Raw 264.7 macrophages: mode of action of a fermented papaya preparation. **Life Sci.**, vol. 67, p. 679-694, 2000.

RODRIGUES, C.M.; SANNOMIYA, M.; COELHO, R.G.; 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.**, vol. 1035, n. 1, p.47-51, 2004.

ROITT, I. BROSTOFF, J.; MALE, D.; Imunologia. **Manole**, São Paulo, p. 423, 1999.

ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D.; Imunologia. **Manole**, São Paulo, p.1-4, 2003.

RYU, J.H.; AHN, H.; KIM, J.Y.; Inhibitory activity of plant extracts on nitric oxide synthesis in LPS-activated macrophages. **Phyt. Res.**, vol. 17, p. 485-489, 2003a.

RYU, J.H.; AHN, H.; JIM LEE, H.; Inhibition of nitric oxide production on LPS-activated macrophages by kazinol B from *Broussonetia kazinoki*. **Fitoter.**, vol.74, p. 350-354, 2003b.

SANNOMIYA, M.; FIGUEIREDO, M.E.; LIMA, C.A.H.; BRITO, A.R.M.S.; ROLIN, L.F.; VILEGAS, W.; TAMASHIRO, J.; Quercetina-3-O- α -L-arabinopiranosídeo das folhas de *Byrsonima intermedia*. **Resumo apresentado à Sociedade Brasileira de Botânica**, 2004.

SANTOS PIMENTA, L.P.; PINTO, G.B.; TAKAHASHI, J.A.; SILVA, L.G.; BOAVENTURA, M.A.; Biological screening of annonaceous Brazilian medicinal plants using *Artemia salina* (brine shrimp test). **Phytomed.**, vol. 10, p. 209-212, 2003.

SCHACHNA, L.; The anti-TNF revolution in ankylosing spondylitis. **Med. J. Aust.**, vol. 181, n. 10, p. 529-530, 2004.

SHEEHAN, C.; Principles and laboratory diagnosis clinical immunology. **J.B. Lippincott Comp.**, Philadelphia, 1990.

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. **Ed. WWF**, Brasília, 2001.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; de MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROCICK, P.R.; Farmacognosia: da planta ao medicamento. **Ed. UFSC**, 2ª ed., 2000.

SOLIMAN, K.F.; MAZZIO, E.A.; *In vitro* attenuation of nitric oxide production in C6 astrocyte cell culture by various dietary compounds. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, vol. 218, n. 4, p. 390-397, 1998.

SURH, Y.J.; CHUN, K.S.; CHA, H.H.; HAN, S.S.; KEUM, Y.S.; PARK, K.K.; LEE, S.S.; Molecular mechanisms underlying chemopreventive activities of anti-inflammatory phytochemicals: down-regulation of COX-2 and iNOS through suppression of NF-kappa B activation. **Mut. Res.**, vol. 480, p. 243-268, 2001.

SUYENAGA, E.S.; RECHE, E.; FARIAS, F.M.; SCHAPOVAL, E.E.; CHAVES, C.G.; HENRIQUES, A.T.; Antiinflammatory investigation of some species of *Mikania*. **Phytoth. Res.**, vol. 16, p. 519-523, 2002.

TSAI, S.H.; LIN-SHIAU, S.Y.; LIN, J.K.; Suppression of nitric oxide synthase and the downregulation of the activation of NFkappa B in macrophages by resveratrol. **Br. J. Pharmacol.**, vol. 126, n. 3, p. 673-680, 1999.

UDDIN, Q.; MALIK, A.; AZAM, S.; HADI, N.; AZMI, A.S.; PARVEEN, N.; KHAN, N.U.; HADI, S.M.; The biflavonoid, amentoflavone degrades DNA in the presence of copper ions. **Toxicol. In vitro**, vol. 18, n. 4, p. 435-440, 2004.

URREA-BULLA, A.; SUAREZ, M. M.; MORENO-MURILLO, B.; Biological activity of phenolic compounds from *Alchornea glandulosa*. **Fitoterapia**, vol. 75, p. 392-394, 2004.

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

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.**, vol. 42, p. 2029-2035, 2004.

VERSCHAEVE, L.; KESTENS, V.; TAYLOR, J.L.S.; ELGORASHI, E.E.; MAES, A.; PUVVELDE, L.V.; KEMPE, N.D.; STADEN, J.V.; Investigation of the antimutagenic effects of selected South African medicinal plant extracts. **Toxicol. in Vitro**, vol. 18, p. 29-35, 2004.

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.**, vol. 557, p. 85-97, 2005.

VIZOSO, A.P.; LÓPEZ, A.G.; RUIZ, A. R.; PILOTO, J.; Estudio toxicogénico de un extracto fluido de *Ocimum basilicum* L. (*albanaca blanca*). **Rev. Cub. Plant. Med.**, vol. 5, n. 3, p. 78-83, 2002.

WILLIAMS, J.E.; Review of antiviral and immunomodulating properties of plants of the Peruvian rainforest with a particular emphasis on Uña de Gato and Sangre de Grado. **Altern. Med. Rev.**, vol. 6, p. 567-579, 2001.

WISEMAN, S.A.; BALENTINE, D.A.; FREI, B.; Antioxidants in tea. **Food Sci. Nutr.**, vol. 37, p. 705–718, 1997.

WOO, E.R.; LEE, J.Y.; CHO, I.J.; KIM, S.G.; KANG, K.W.; Amentoflavone inhibits the induction of nitric oxide synthase by inhibiting NF-kappa B activation in macrophages. **Pharmacol. Res.**, vol. 51, n. 6, p. 539-546, 2005.

YAMADA, C.S.B.; Fitoterapia: sua história e importância. **Revista Racine**, vol. 43, p. 50-51, 1998.

YEN, G.C.; CHEN, H.Y.; PENG, H.H.; Evaluation of the cytotoxicity, mutagenicity and antimutagenicity of emergency edible plants. **Food and Chemical Toxicol.**, vol. 39, p. 1045-1053, 2001.

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

YUNES, R.A.; PEDROSA, R.C.; CECHINEL FILHO, V.; Fármacos e fitoterápicos: a necessidade de desenvolvimento da indústria de fitoterápicos no Brasil. **Quim. Nova**, vol. 24, n. 1, p. 147-152, 2001.

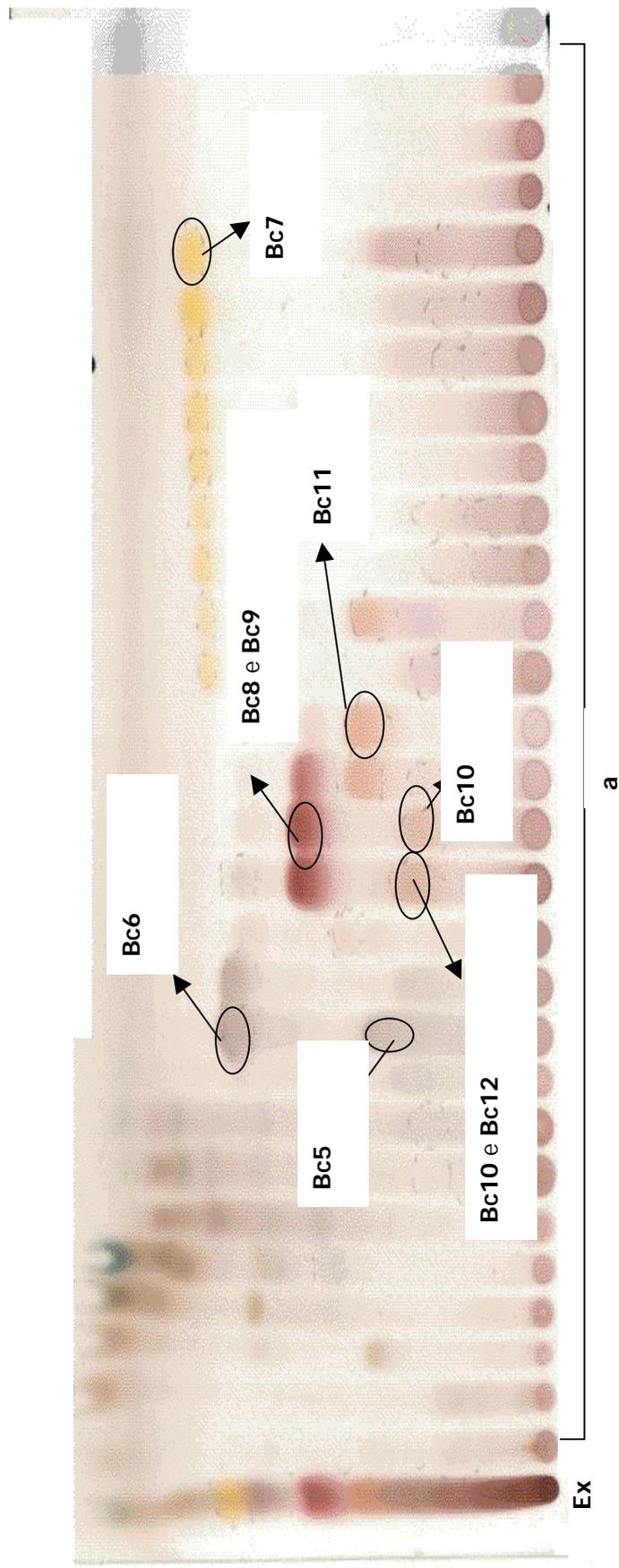
ZEIGER, E.; Mutagens that are not carcinogens: fault theory our fault tests? **Mutat.Res.**, vol. 492, p. 29-38, 2001.

ZHOU, S.; KOH, H.; GAO, Y.; GONG, Z.; LEE, E.J.D.; Herbal bioactivation: The good, the bad and the ugly. **Life Sci.**, vol. 74, p. 935-968, 2004.

ZIBOH, V.A.; BANERJEE, T.; VLIET, A.; Downregulation of COX-2 and iNOS by amentoflavone and quercetin in A549 human lung adenocarcinoma cell line. **Prostag. Leukotr. and Ess. Fat.Acids**, vol. 66, n. 5-6, p. 485-492, 2002).

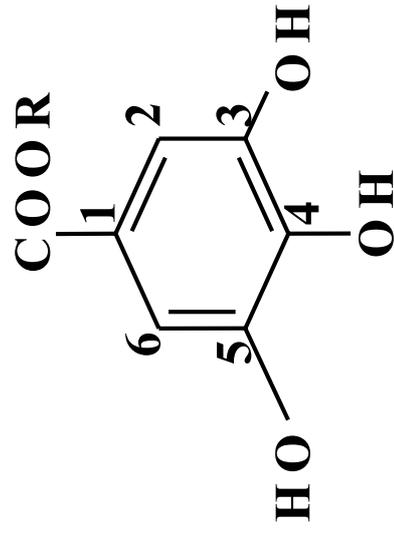
ZWILLING, B.S.; EISENSTEIN, T.K.; Macrophage-pathogen interactions. **Marcel Dekker**, p. 634, 1994.

Anexo 1. CCD do extrato metanólico (EMeOH) e frações obtidas da coluna de Sephadex LH-20.



FM: $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 75:25 (v/v), Revelador: anisaldeído sulfúrico, a: frações da coluna, Ex: EMeOH de Bc
 Ácido gálico (**Bc5**), galato de metila (**Bc6**), quercetina-3-*O*-β-D-galactopiranosídeo (**Bc10**), quercetina-3-*O*-β-D-glucopiranosídeo (**Bc12**), (+)-catequina (**Bc8**), (-)-epicatequina (**Bc9**), quercetina-3-*O*-α-L-arabinopiranosídeo (**Bc11**)

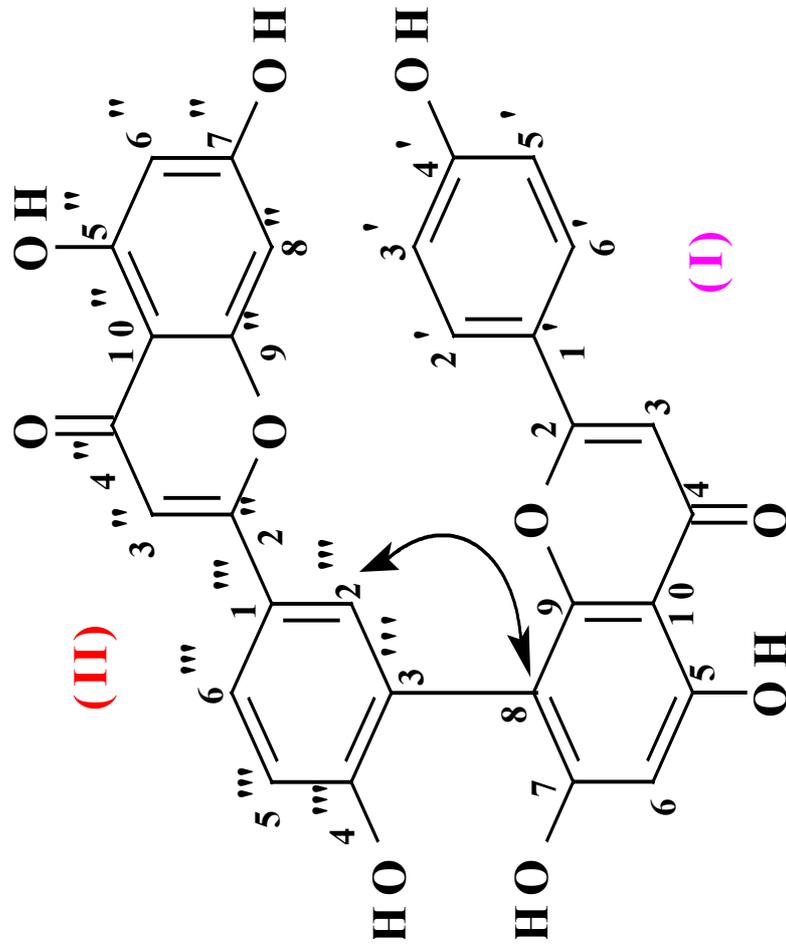
Anexo 2. Estrutura das moléculas de ácido gálico e galato de metila, isoladas da fração acetato de etila do extrato metanólico de *B. crassa* Niedenzu.



R=H , **Ácido gálico**

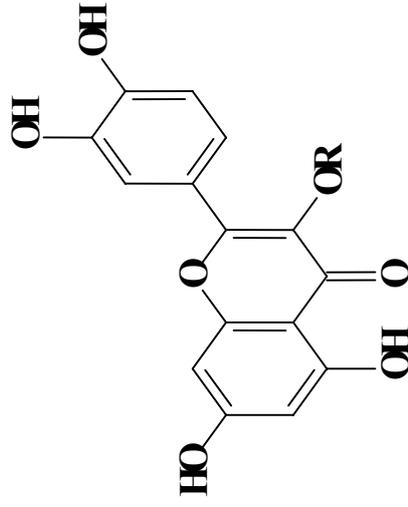
R=CH₃ **Galato de metila**

Anexo 3. Estrutura da molécula de amentoflavona, isolada da fração acetato de etila do extrato metanólico de *B. crassa* Niedenzu.



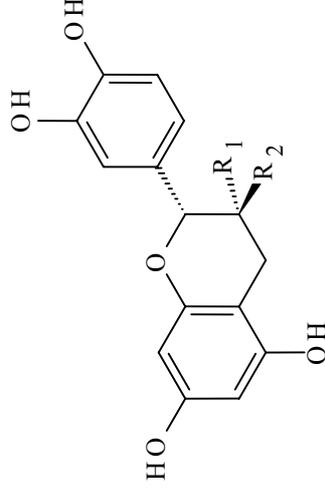
Observação: I e II correspondem às unidades de deslocamento molecular trabalhadas na identificação da amentofalvona por RMN.

Anexo 4. Estruturas químicas das moléculas de (+)-catequina, (-)-epicatequina e quercetina ligada a diferentes moléculas de açúcar, extraídas da fração acetato de etila do extrato metanólico de *B. crassa*



R=β-D-galactopiranosídeo

R=α-L-arabinopiranosídeo

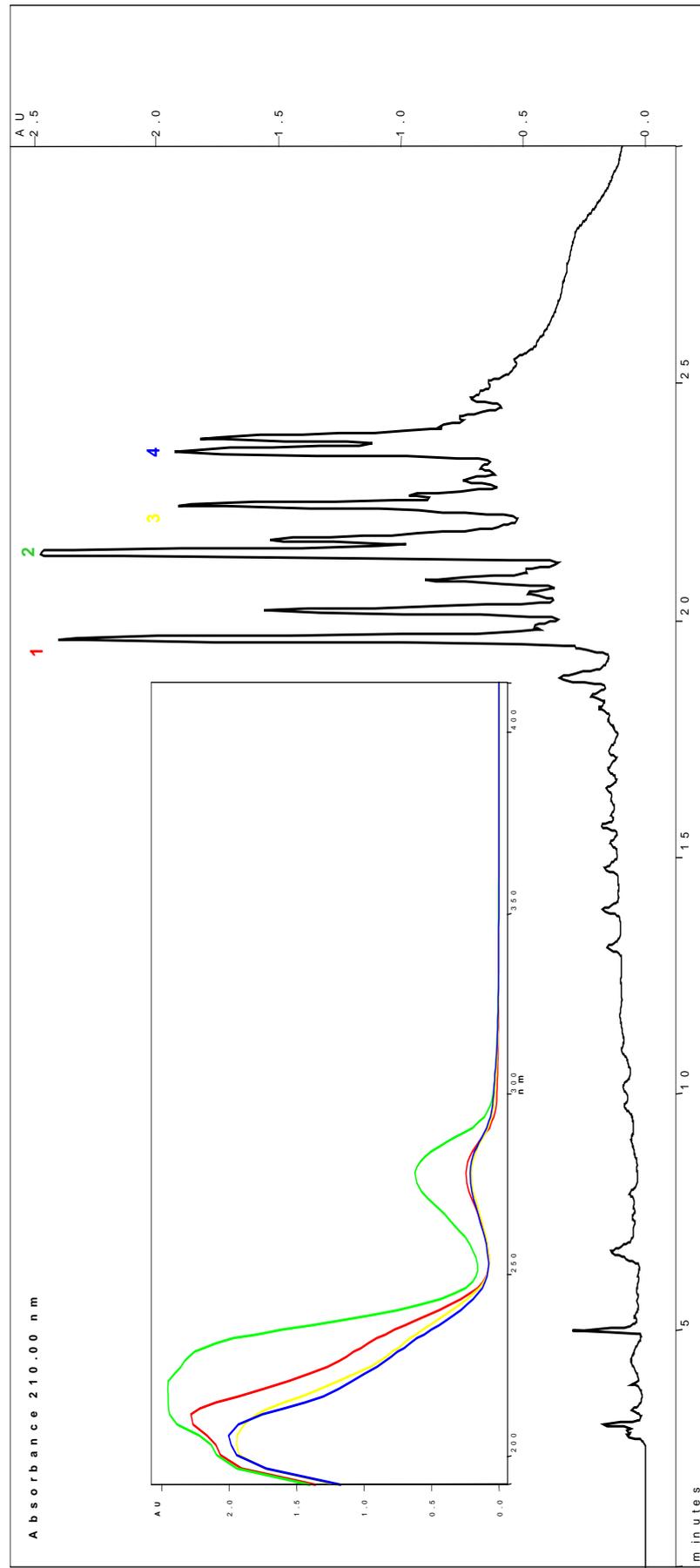


R₁=H e R₂=OH,
(+)-catequina

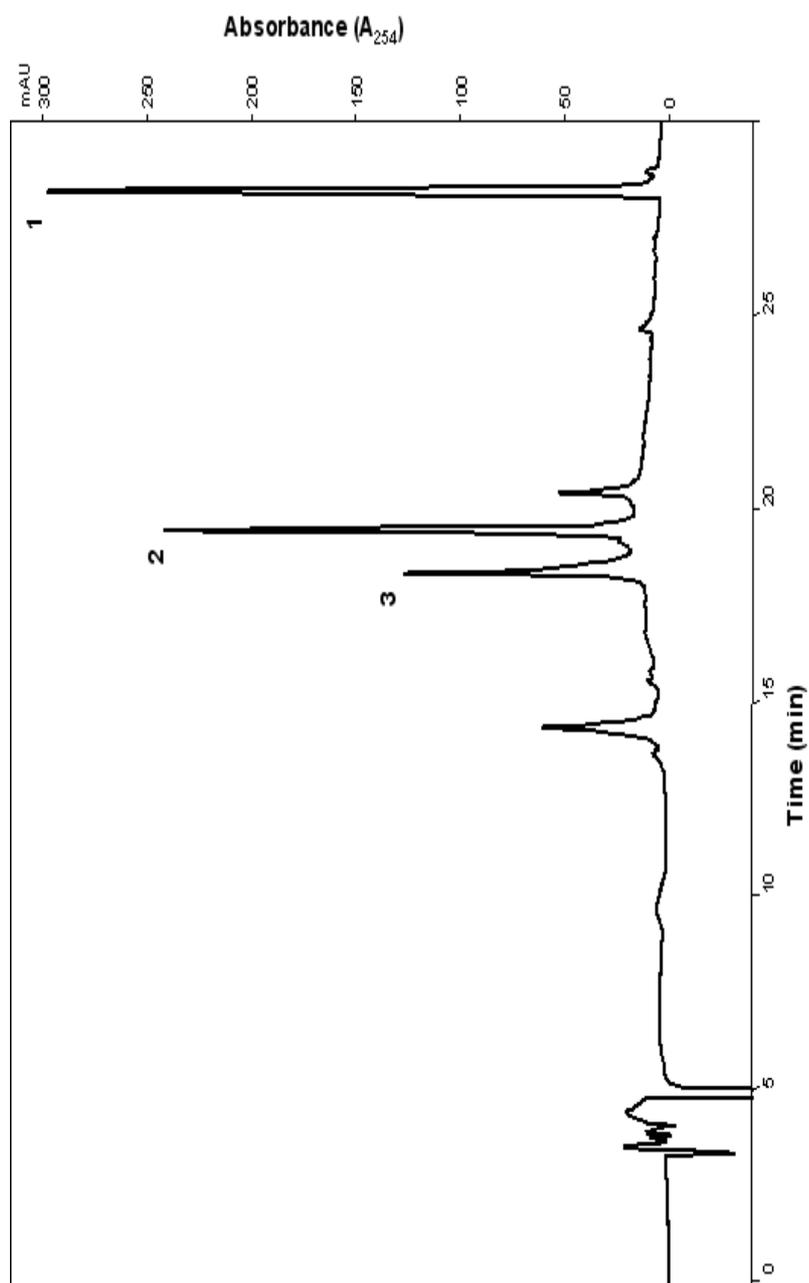
R₁=OH e R₂=H,
(-)-epicatequina

Anexo 5. Cromatograma da fração aquosa do extrato metanólico de *B. crassa* Niedenzu (HPLC).

RP-18, 250 x 4,60 mm d.i. x 5 μm , FM modo gradiente linear de acetonitrila/água (10-100%) em 30 min, fluxo de 0,8 ml min⁻¹, λ 210 nm. Os picos marcados (1-4) revelam a presença de catequinas e saponinas.



Anexo 6. Cromatograma da fração acetato de etila do extrato metanólico de *B. crassa* Niedenzu (HPLC).



Coluna de fase reversa Phenomenex Luna, C₁₈ (250 x 4.60 mm I.D., 5 μm); fase móvel: gradiente linear de Acetonitrila/H₂O (10-100%) em 30 min, fluxo: 0.8 ml min⁻¹, detecção a 254 nm. Pico 1=Amentoflavona, pico 2= quercetina-3-O-α-L-arabinopiranosídeo e pico 3= quercetina-3-O-β-D-galactopiranosídeo.

Anexo 7: Preparo de soluções, reagentes e meios de cultura

SOLUÇÕES UTILIZADAS NOS ENSAIOS IMUNOLÓGICOS

- Meio RPMI-1640

Utilizar frasco de 1000mL para água milli-Q, acrescentar:

HEPES.....2,38g

Bicarbonato de sódio.....2g

Ajustar o pH em 7,0-7,2. Em seguida, completar o volume para 100mL e esterilizar utilizando membrana de 0,22 μ m. Após esterilização, aliquotar o meio em frascos de 100mL. Estocar sob refrigeração a 4°C.

No momento do uso, adicionar penicilina (100U/mL), estreptomicina (100U/mL), glutamina (2mM), mercaptoetanol (50mM) e 5% de soro fetal bovino.

- Solução salina tamponada com fosfato (PBS)

Solução 1

Na₂HPO₄ x H₂O.....27,4g

Água milli-Q q.s.p.....386mL

Solução 2

NaH₂PO₄ x H₂O.....7,88g

Água milli-Q q.s.p.....114mL

Solução estoque: preparar, inicialmente, as soluções 1 e 2. Em seguida, misturar as duas soluções e completar o volume para 100mL com água milli-Q e autoclavar. O pH deve ser de 7.2. Armazenar sob refrigeração (4°C).

Solução de uso: o modo de preparo está descrito a seguir:

Solução estoque.....40 mL

MaCl.....8,5g

Água milli-Q q.s.p.....1000mL

Ajustar o pH, se necessário, e autoclavar. Armazenar sob refrigeração (4°C).

- Tampão fosfato de potássio

Fosfato dissódico anidro.....11,46g

Na₂HPO₄.7H₂O.....21,57g

Fosfato monopotássico.....2,65g

Água destilada q.s.p.....1000mL

Acertar o pH em 7.2.

- Reagente de Griess

Sulfanilamida.....1,0g

Naftiletlenodiamina.....0,1g

Ácido orto-fosfórico.....2,5mL

Água milli-Q q.s.p.....100mL

Dissolver a sulfanilamida e a naftiletlenodiamina. Acrescentar, aos poucos, o ácido fosfórico. Completar o volume para 100mL. Manter o reagente sob refrigeração (4°C). Proteger da luz.

- Líquido de Lázarus

Violeta de genciana 1%.....2mL

Ácido acético glacial.....3mL

Água destilada q.s.p.....100mL

- Tioglicolato 3%

Colocar 3g do meio em 100mL de água destilada. Distribuir em tubos e autoclavar.

- Solução de LPS

Dissolver 1 mg de LPS em 1 mL de meio RPMI, esterilizar por filtração utilizando membrana de 0,22µm e armazenar a -20°C. Posteriormente, diluir para a concentração de 1µg/mL, utilizando meio RPMI-1640.

- Meio básico de Eagle (Sigma)

Com sais de Eagle e L-glutamina, na ausência de bicarbonato de sódio. Preparo segundo recomendações do fabricante e armazenado a 2-8°C.

SOLUÇÕES UTILIZADAS PARA OS ENSAIOS DE MUTAGENICIDADE

- 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/Biotona (0,5mM)

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(1).....0,75g

Ácido cítrico(2)7,5g

Fosfato de potássio dibásico(3).....37,5g

Fosfato de sódio e amônio(4).....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 0,2M

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 0,4M

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.....10 mL

- Solução NAPD 0.1 M

NAPD.....0,7654g

H₂O destilada.....10mL**Controle e testes das linhagens de *Salmonella typhimurium* utilizadas no Teste de Ames****1) SENSIBILIDADE AO CRISTAL VIOLETA**

- 1 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

2) 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.

3) TUBOS DE CONGELAMENTO

- 1mL cultura

- 0,2mL DMSO

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

4) ENSAIO PARA TESTAR AS CARACTERÍSTICAS GENOTÍPICAS

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);

Cristal violeta: antibiograma, 10µL/disco;

Biotina: esparramar 0,1mL da solução de biotina com drigalski, esperar secar e fazer estrias com a cultura (2 linhagens/placa);

Biotina/histidina: com o mesmo procedimento acima, colocar primeiro a biotina.

5) CONTROLES POSITIVOS

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

6) CULTURA (estoque)

- 30mL de caldo nutriente;
- Linhagens (TA): 95 μ L de ampicilina (8mg/mL);
- Acrescentar o antibiótico após a esterilização dos meios.

Resistência à ampicilina:

- linhagens por placa;
- NaOH 0,02N (0,024g NaOH – 3 mL água destilada);

Filtrar a solução final em Millipore.

Sensibilidade a luz UV:

- 30 cm por 8 segundos;
- 1 linhagem por placa (100 μ l de cultura, com drigalski);
- deixar as placas abertas.

Requerimento de HISTIDINA/BIOTINA:

- 2 linhagens por placa;
- AMG;
- BIOTINA (0,5mM): 0,0012g – 100mL água destilada
- HISTIDINA (0,5%): 0,015g – 3 mL água destilada
- autoclave.