

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

CAMPUS DE ARARAQUARA

ENSAIOS DE MUTAÇÃO GÊNICA REVERSA E TESTE DO MICRONÚCLEO
PARA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MUTAGÊNICA DE *Pouteria torta* E

Pouteria ramiflora

JULIANA FERREIRA DE SOUSA

Araraquara - 2011

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

CAMPUS DE ARARAQUARA

ENSAIOS DE MUTAÇÃO GÊNICA REVERSA E TESTE DO MICRONÚCLEO

PARA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MUTAGÊNICA DE *Pouteria torta* E

Pouteria ramiflora

Aluna: Juliana Ferreira de Sousa

Orientadora: Prof^a Dr^a Eliana Aparecida Varanda

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Farmácia-Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara da Universidade Estadual Paulista para obtenção do grau de Farmacêutico-Bioquímico.

Araraquara – 2011

SUMÁRIO

Resumo

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Lista de Abreviaturas e Siglas

1. Introdução.....	7
1.1. Plantas Medicinais.....	7
1.2. O gênero <i>Pouteria</i>	9
1.3. Teste de Ames.....	14
1.4. Teste do Micronúcleo.....	16
2. Objetivos.....	19
3. Materiais e Métodos.....	20
3.1. Material Vegetal.....	20
3.2. Teste de Ames.....	20
3.2.1 Linhagens utilizadas.....	20
3.2.2 Manutenção e estoque das cepas de <i>Salmonella typhimurium</i>	21
3.2.3 Verificação das características genéticas das cepas de <i>S. Typhimurium</i>	21
3.2.4 Preparo dos inóculos de <i>S. typhimurium</i> utilizados nos ensaios.....	21
3.2.5 Meios de cultura.....	22
3.2.6 Controles.....	23
3.2.7 Preparo da mistura S9.....	23
3.2.8 Realização dos ensaios.....	24
3.2.9 Forma de análise dos resultados.....	24

3.3. Teste do Micronúcleo.....	25
3.3.1 Preparo das lâminas.....	25
3.3.2 Animais e doses utilizadas.....	26
3.3.3 Obtenção do sangue.....	27
3.3.4 Análise dos resultados obtidos.....	27
4. Resultados.....	28
4.1. Teste de Ames.....	28
4.1.1 <i>P. ramiflora</i>	28
4.1.2 <i>P. torta</i>	29
4.2. Teste do Micronúcleo.....	34
5. Discussão.....	36
6. Conclusões.....	41
7. Referências Bibliográficas.....	41
8. Anexo.....	50

RESUMO

O Brasil é um país dotado de Biodiversidade incomparável da qual advém inúmeras plantas medicinais que são frequentemente utilizadas de acordo com conhecimento empírico da população em geral. Considerando a importância de investigar os efeitos farmacológicos e toxicológicos de espécies vegetais utilizadas com fins terapêuticos, foi objetivo do presente trabalho avaliar a atividade mutagênica dos extratos metanólicos e hexânicos de *Pouteria ramiflora* e *Pouteria torta*, pois seus dados farmacológicos descritos na literatura são bastante restritos, destacando-se as atividades antimicrobiana, citotóxica e imunomoduladora. Como ferramenta foram escolhidos os testes de Ames e do Micronúcleo, pois ambos são preconizados pela ANVISA em testes de toxicidade de fitoterápicos. No Teste de Ames foram utilizadas as linhagens TA100, TA98, TA97a e TA102 de *Salmonella typhimurium* em presença e ausência de metabolização e no ensaio do micronúcleo foi utilizado o sangue periférico de camundongos Swiss tratados *in vivo*. Os resultados constataram que os extratos de ambas as espécies provocaram desvios da normalidade, ou seja, o Teste de Ames detectou aumento no número de revertentes por placa e o Teste do micronúcleo mostrou aumento significativo no número de células micronucleadas. Esses resultados demonstraram claramente que as duas espécies de *Pouteria* estudadas apresentaram potencial mutagênico e, portanto, o uso popular dessas plantas deve ser feito com cautela.

Palavras-chave: *Pouteria*, Teste de Ames, Teste do Micronúcleo, mutagenicidade, *S. typhimurium*.

LISTA DE FIGURAS

1	. Distribuição do gênero <i>Pouteria</i> no mundo.....	10
2	. Espécies de <i>Pouteria</i> inventariadas pelo Projeto Biota (Fapesp).....	10
3	Árvore, folhas, frutos, sementes, cascas e madeira tratada de <i>P. ramiflora</i>	12
4	Árvore, folhas, frutos, sementes, cascas e madeira tratada de <i>P. torta</i>	12

LISTA DE TABELAS

1.	Atividade mutagênica expressa pela media, desvio padrão e RM do número de revertentes por placa nas linhagens TA 100, TA 98, TA 102 e TA97a de <i>S. typhimurium</i> expostas aos extratos metanólico e hexânico de <i>P. ramiflora</i> , em várias doses, com e sem S9.....	30
2.	Atividade mutagênica expressa pela média, desvio padrão e RM do número de revertentes por placa na linhagem TA102 de <i>S. typhimurium</i> exposta ao extrato hexânico de <i>P. ramiflora</i> , em várias doses, sem S9.....	31
3.	Atividade mutagênica expressa pela media, desvio padrão e RM do número de revertentes por placa nas linhagens TA 100, TA 98, TA 102 e TA97a de <i>S. typhimurium</i> expostas aos extratos metanólico e hexânico de <i>P. torta</i> , em várias doses, com e sem S9.....	32
4.	Resultado da avaliação da mutagenicidade dos extratos analisados com as linhagens TA97a, TA98, TA100 e TA102 de <i>S. typhimurium</i> com e sem S9.....	33
5.	Número de eritrócitos micronucleados por animal antes do tratamento com extrato de <i>P. torta</i>	35
6.	Número de eritrócitos micronucleados por animal 30h após tratamento com os extratos.....	36

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

OMS.....	Organização Mundial da Saúde
AIDS.....	<i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i>
IBAMA.....	Instituto Brasileiro Do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
HIV.....	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
NO.....	Óxido nítrico
ANVISA.....	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
DNA.....	Ácido Desoxirribonucléico
ANOVA.....	Análise de Variância
DMSO.....	Dimetilsulfóxido
AMG.....	Ágar mínimo glicosado
NPD.....	4-nitrofenilenodiamino
CETESB.....	Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental
RM.....	Razão de Mutagenicidade
S9.....	Sistema de ativação metabólica

1. INTRODUÇÃO

1.1 Plantas Medicinais

O Homem utiliza plantas para tratar enfermidades desde a mais remota antiguidade. Dados de literatura sobre a utilização de espécies vegetais para cura de doenças e outros males são encontrados desde 50.000 anos atrás. Intuitivamente o homem primitivo buscou descobrir soluções para suas necessidades básicas. Através de suas experiências e observações sofreu um processo evolutivo, descobrindo nas plantas o tratamento de doenças. Além das plantas benéficas, foram também descobertas as nocivas capazes de matar e produzir alucinações (Devienne et al., 2004).

A forma como cada pessoa utiliza as plantas disponíveis no ambiente varia de acordo com seu conhecimento, habilidade e praticas baseadas em teorias, crenças e experiências comprovadas ou não. Esse conjunto de paradigmas constitui o que se conhece por medicina tradicional (OMS, SD).

Segundo a OMS, planta medicinal é aquela que possui, em um ou vários de seus órgãos, substâncias que possam ser utilizadas para fins terapêuticos ou que sejam precursores de fármacos semi-sintéticos. Essas substâncias são chamadas de princípios ativos. Estes princípios ativos são produzidos pelo metabolismo secundário das plantas que, apesar de não ser essencial para o crescimento e desenvolvimento da planta, possui funções ecológicas importantes para a sobrevivência da espécie e para a sua continuidade dentro do ecossistema.

As plantas medicinais são utilizadas atualmente na prática da fitoterapia e suas propriedades são estudadas nos laboratórios, a fim de garantir a segurança do uso e o isolamento de novas substâncias com propriedades medicinais, persistindo na busca de plantas eficazes, com baixo risco de uso, reprodutibilidade e qualidade que possam tratar e/ou curar doenças ainda sem boas perspectivas de tratamento e cura, como câncer e AIDS. Além disso, substâncias naturais podem servir de modelo para moléculas sintéticas.

Assim, quando se encontra uma substância ativa, capaz de tratar alguma enfermidade deve-se testá-la para que se certifique a existência de propriedades terapêuticas e avaliar quais os riscos que o uso dessa substância pode acarretar. Um dos riscos mais importantes que se deve pesquisar é o de mutagenicidade, que é definida como a capacidade de gerar alteração permanente no material genético de um organismo, ou seja, o agente químico induz mutações cujo acúmulo possui potencial carcinogênico (Dearfield, 2002).

Há muitos anos plantas medicinais tradicionais têm sido usadas contra diversas doenças e provaram ser eficientes na cura dos indivíduos que a consomem (Verschaevea e Van Staden, 2008). É importante lembrar que a maioria dessas plantas nunca foi submetida a exaustivos testes de toxicidade, os quais são requeridos para compostos farmacêuticos modernos. Baseado no uso tradicional por longos períodos de tempo essas plantas assumiram a característica de serem seguras. Porém, pesquisas têm mostrado que várias espécies possuem atividades mutagênica (Cardoso et al., 2006; Déciga-

Campos et al., 2007; Mohd-Fuat et al., 2007) ou tóxica *in vitro* e propriedades carcinogênicas (De Sá Ferreira e Vargas, 1999).

Assim, deve-se testar qual o potencial benéfico e qual o potencial maléfico de uma planta medicinal, ou seja, pesar o risco-benefício e estruturar estratégias para aproveitar o máximo possível as qualidades de cada planta sem correr riscos. Por isso, é muito importante que estudos dessa natureza sejam iniciados e mantidos e, além do mais, de acordo com o IBAMA, o Brasil tem a maior biodiversidade do planeta com cerca de 60 mil espécies de plantas superiores conhecidas, o que poderia fazer do país uma potência no ramo de fitoterápicos e, no entanto, essa riqueza é praticamente desconhecida quimicamente. Há que se investir em pesquisas que contemplem essa necessidade e programas de preservação e uso sustentável da biodiversidade brasileira, impedindo o esgotamento dessa enorme fonte de riquezas e saúde.

1.2. O Gênero *Pouteria*

A família Sapotaceae compreende cerca de 53 gêneros e 1250 espécies distribuídas em todo o planeta, principalmente nas regiões tropicais e subtropicais, sendo que 12 deles, com cerca de 103 espécies, são encontrados no Brasil (Swenson & Anderberg, 2005; Joly, 1998). São plantas nativas do cerrado (clima tropical) facilmente encontradas na região centro-sul do país e na Amazônia. A Figura 1 e a Figura 2 mostram a distribuição do gênero *Pouteria* no planeta e no estado de São Paulo, respectivamente.

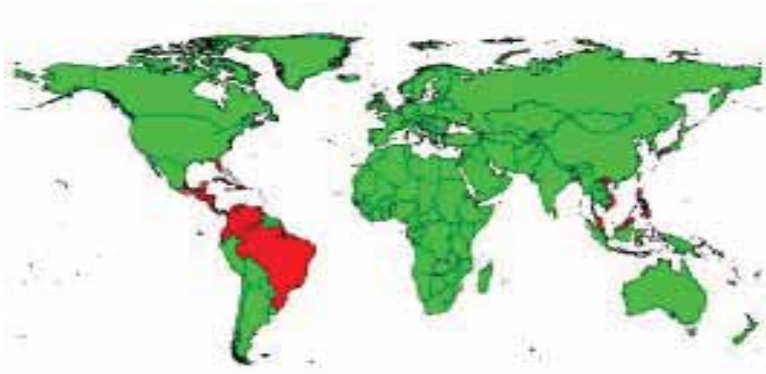


Figura 1. Distribuição mundial do gênero *Pouteria* (Peiler, 2004). Destacada em vermelho a presença do gênero.

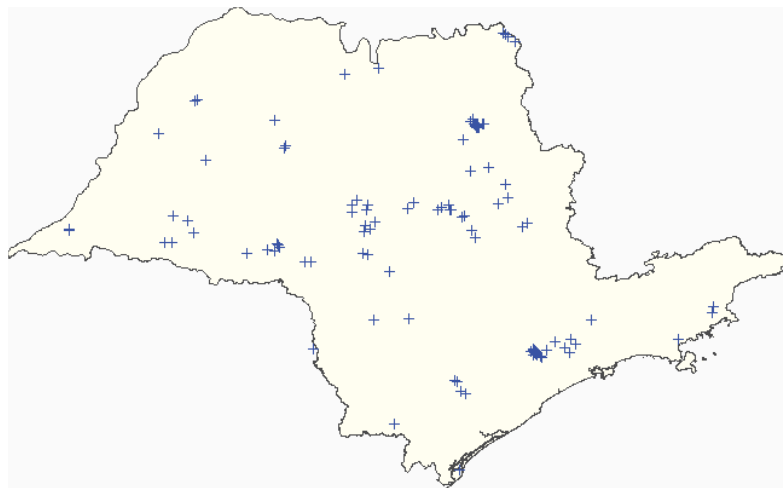


Figura 2. Espécies de *Pouteria* inventariadas pelo projeto Biota/Fapesp.

Muitas espécies deste gênero tem sido utilizadas na medicina popular para tratar febre, inflamações, erupções de pele, úlceras, diabetes (Ma et al., 2004; Montenegro et al., 2006), diarreia (Perfeito et al., 2005), vômitos, náuseas, dores nas costas e para estimular lactação (Manosroi et al., 2006).

Os dados farmacológicos do gênero descritos na literatura ainda são bastante restritos, entretanto, destacam-se as atividades antimicrobiana, citotóxica e imunomoduladora. Existem alguns trabalhos sobre a química deste gênero, os quais destacam a presença de compostos como terpenóides e polifenóis. Inúmeros terpenóides destacam-se como anticarcinogênico, antiinflamatório e anti-HIV. Muitos polifenóis são relatados como antioxidante, antimutagênico, anticarcinogênico e antiproliferativo (Alves, 2007).

P. ramiflora (Sapotaceae) é conhecida popularmente como leiteiro-preto, ablu, ablu-carriola, massaranduba, massaranduba-vermelha, ibacoixa, gunjara, mandapuca e pitomba-de-leite (Figura 3) e *P. torta* é conhecida popularmente como abiu-piloso, curiola, guapeva, açã-ferro, abiu do cerrado, guapeba, cabo-de-machado, pêssago-do-mato e abiurana (Figura 4).

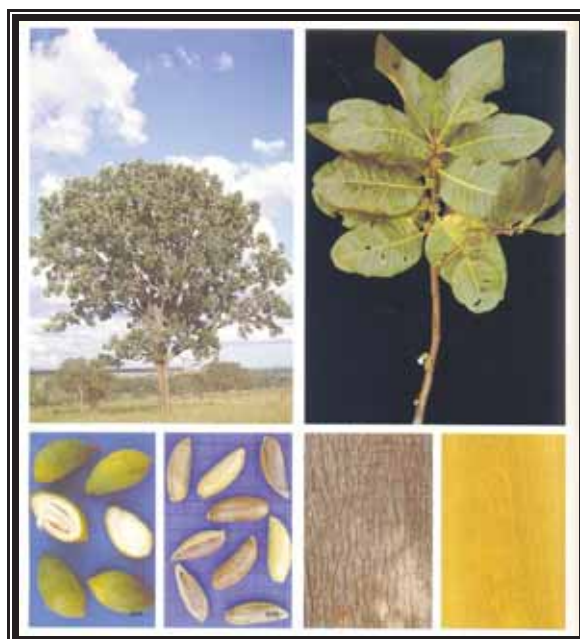


Figura 3. Árvore, folhas, frutos, sementes, cascas e madeira tratada de *P. ramiflora* (Lorenzi, 1998).

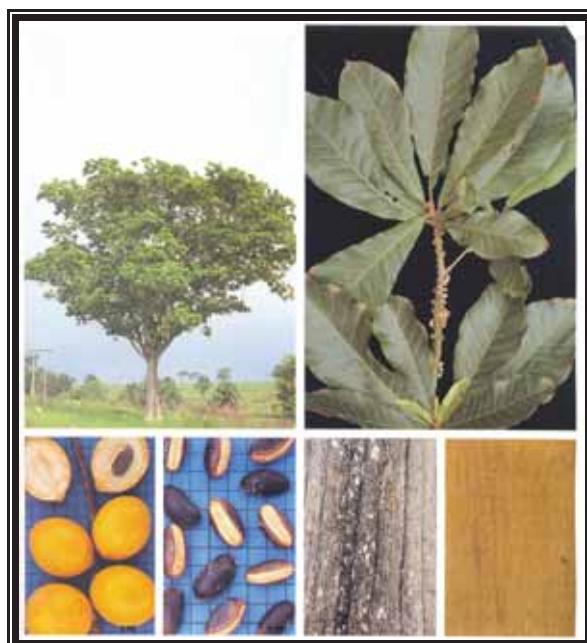


Figura 4. Detalhe da árvore, folhas, frutos, semente, cascas e madeira tratada de *P. torta* (Lorenzi, 1998).

P. torta é uma das espécies mais estudadas. Dos extratos hexânico e diclorometânico das flores e frutos foram isoladas α e β -amirina (sendo que

esta também foi isolada das folhas), lupeol, taraxasterol, pseudotaraxasterol, cicloartenol, lanosterol, lanosta-7,24-dien e palmitato de eritrodio. Ácidos graxos, triglicerídeos e hidrocarbonetos de cadeia normal e ramificada também foram isolados desses extratos (Silveira et al., 2009). Desta mesma espécie foram isolados os ácidos betulínico e ursólico do extrato metanólico. Estes ácidos e α e β -amirina foram também isoladas de *P. tomentosa* (Silveira et al., 2009).

Perfeito et al. (2005) demonstraram por meio do modelo *Artemia Salina* que o extrato aquoso, a fração clorofórmica do extrato metanólico e o extrato etanólico de *P. torta* são citotóxicos nas concentrações de 0,28mg/ml e 0,27mg/ml, respectivamente e isolaram o acetato de lupeol, um triterpeno presente nesta espécie. Outro composto interessante isolado das sementes de *P. torta* é a pouterina, uma proteína com atividade parecida com a da proteína lecitina (Boleti et al., 2008). A pouterina apresentou capacidade de induzir aglutinação de eritrócitos de humanos, coelhos e ratos (Boleti et al., 2007).

P. ramiflora foi testada quanto às suas propriedades antinociceptivas e antiinflamatórias. Fontes Jr. et al. (2009) testaram o extrato etanólico em ratos e camundongos fazendo uso dos métodos da constrição abdominal, *hotplate test* e testes antiinflamatórios de adenosina desaminase, níveis de NO e cultura de células de defesa. Tal estudo concluiu que o extrato etanólico de *P. ramiflora* possui propriedades analgésicas e antiinflamatórias, fato que embasa seu uso popular mesmo sendo desconhecidos os mecanismos através dos quais esse efeito farmacológico ocorre.

Napolitano et al. (2005) estudaram a atividade imunológica dos extratos etanólico e hexânico de *P. ramiflora*. Os resultados mostraram que os extratos não inibem a produção de NO em macrófagos ativados e não apresentaram citotoxicidade no teste MTT de viabilidade celular.

Dada a presença de tantas substâncias ativas neste gênero, a possibilidade da produção de medicamentos para tratamento de várias doenças a partir delas e seu uso pela população, verifica-se a necessidade e a grande importância do estudo da atividade dessas plantas no material genético. Para tal finalidade foram adotadas as metodologias do teste de Ames e do teste do micronúcleo, pois estes protocolos são recomendados tanto pela ANVISA (RE nº 90 de 2004) quanto por várias agências regulatórias internacionais para a condução de ensaios de genotoxicidade, como uma parte dos estudos de segurança de medicamentos fitoterápicos.

1.3. Teste de Ames

O teste de Ames avalia a atividade mutagênica de amostras ou misturas complexas utilizando linhagens histidina dependentes de *S. typhimurium* na presença e ausência de S9. Na presença do mutágeno, as bactérias sofrem reversão da mutação His- e voltam a comportar-se como linhagem selvagem (histidina independente), sendo identificadas por essa habilidade.

Utilizando o teste de Ames, Konan et al. (2007) investigaram a biossegurança do extrato hidroalcoólico das folhas de *Anacardium occidentale* L. (cajuzeiro), planta nativa do Brasil. O extrato, cuja análise fitoquímica revelou

a presença majoritária de taninos e flavonóides, apresentou indícios de mutagenicidade na linhagem TA98, em ausência de S9, e na linhagem TA102, em experimento realizado com S9.

Com esta mesma metodologia, Cardoso et al. (2006) avaliaram o efeito mutagênico de compostos isolados (quercetina-3-O- β -D-galactopiranosídeo, quercetina-3-O- α -L-arabinopiranosídeo, amentoflavona, galato de metila e (+)-catequina) e do extrato metanólico das folhas de *Byrsonima crassa* Niedenzu (IK), planta nativa do cerrado brasileiro, utilizada no tratamento de picadas de cobras, febres, infecções cutâneas e disfunções gástricas (Amarquaye et al., 1994). Obtiveram mutagenicidade positiva para o extrato metanólico e esse efeito foi atribuído principalmente a amentoflavona.

Utilizando o Teste de Ames Cherdshewasart et al. (2009) avaliaram o potencial mutagênico de *Pueraria mirifica* e *Pueraria lobata*, duas plantas medicinais nativas da Tailândia e Japão, respectivamente popularmente utilizadas para tratar os sintomas da menopausa. Obtiveram resultado negativo, sugerindo que o uso dessas plantas é seguro.

Vinod et al. (2011) avaliaram, pela metodologia de Ames, o potencial mutagênico e antimutagênico do extrato do óleo e do óleo das sementes de *Azadirachta indica*, planta medicinal nativa da Índia popularmente usada para tratar inflamações de diversas doenças, malária, afecções de pele, úlceras ou ainda usada como agente antifúngico ou antibacteriano. Foram utilizadas as linhagens TA98, TA100 e TA102 de *S. typhimurium*. Os testes com o óleo e com seu extrato não apresentaram aumento significativo no número de revertentes por placa, ou seja, ambos foram considerados não mutagênicos na

presença e na ausência de S9. A maior dose do óleo (100mg/placa) provocou turbidez na placa e a maior concentração do extrato do óleo (1000ug/placa) foi tóxica.

1.4. Teste do micronúcleo

Nos últimos tempos a metodologia do micronúcleo se tornou muito importante para testes de mutagenicidade devido à sua capacidade de evidenciar eventos aneugênicos e clastogênicos, simplicidade de análise, acurácia, multipotencialidade e larga aplicabilidade com diferentes tipos de células (Decordier, 2011).

Micronúcleos podem ser encontrados em células como pequenos corpos extranucleares, resultantes de quebra cromossômica e/ou cromossomos inteiros que não migraram para os pólos durante a divisão (Decordier, 2011). Na telófase, quando a carioteca (envoltório nuclear) é reconstituída nas células-filhas, esses cromossomos perdidos ou fragmentos não são incorporados ao núcleo, sendo encapsulados em separado, formando assim um pequeno núcleo denominado micronúcleo (Kirsch-Volders et al., 2002, 2011; Mateuca et al., 2006; Fenech et al., 2011).

A formação de micronúcleos pode ser espontânea ou induzida por mutágenos. A formação espontânea se dá pela perda ocasional de um cromossomo inteiro ou pela expulsão de sequências repetitivas de DNA, como um mecanismo de defesa celular ou contribuição para diferenciação celular (Decordier, 2011). A formação de micronúcleo induzida por mutágeno pode ocorrer por dois mecanismos distintos:

- Aneugenia – ocorre quando o mutágeno provoca a perda de um cromossomo inteiro, gerando uma aneuploidia (célula $2n-1$ + micronúcleo) ou quando o mutágeno provoca erro na mitose de maneira que a célula duplica seu material genético, mas, não divide e sofre a perda de um cromossomo, gerando uma célula $4n-1$ + micronúcleo (Decordier, 2011).

- Clastogenia: ocorre quando o mutágeno inibe o reparo de DNA lesado, provoca quebra no DNA dupla fita ou induz a formação de pontes entre cromossomos. Todos esses tres mecanismos de clastogenia dão origem a uma célula $2n-x$ + micronúcleo (Decordier, 2011).

Utilizando-se dessa metodologia, Silva et al. (2009) avaliaram o potencial citotóxico de extratos de *Cordia ecalyculata* e *Echinodorus grandiflorus*, ambas plantas nativas utilizadas como diurético, anti-inflamatório, supressor de apetite e coadjuvante de perda de peso. Com a análise estatística ANOVA, observou-se um aumento significativo ($P < 0,05$), porém, de pequena magnitude na freqüência de eritrócitos micronucleados no sangue periférico dos animais tratados com extratos das plantas em cheque, quando comparados ao controle negativo. Constatou-se ainda que a freqüência de eritrócitos micronucleados não apresentou diferença significativa ($P > 0,05$) quando comparada dentre as doses de extrato administradas, ou seja, os extratos não interferiram na liberação medular de eritrócitos micronucleados (descendentes de células que tiveram defeitos nos mecanismos de divisão ou quebra cromossomal) com um comportamento dose-independente.

Com a metodologia do teste do Micronúcleo com medula óssea de camundongos, Lynch et al. (2011) avaliaram o potencial mutagênico da

aloesina, uma cromona que foi recentemente identificada como um dos componentes ativos responsáveis pelo efeito anti-diabético do *Aloe spp.*, mais conhecido como babosa. Quando comparados com o controle negativo, os grupos-teste (doses de 1,25, 2,5 e 5,0 g kg⁻¹ de peso corporal) não apresentaram aumento significativo ($P > 0,05$) na frequência de células micronucleadas. Com base neste e nos demais testes realizados (Ames e ensaios com células de mamíferos) o autor concluiu que a aloesina não possui atividade genotóxica.

Dada as atividades citotóxica e antiviral do extrato metanólico de *Verbascum thapsus*, espécie de planta muito abundante na Argentina, Escobar et al. (2011) realizaram um estudo com objetivo de determinar genotoxicidade deste extrato usando o teste do micronúcleo em células de medula óssea. As doses testadas foram de 100, 300 e 500 mg kg⁻¹ de peso corporal. Os resultados mostraram que não houve diferença significativa na frequência de células micronucleadas quando se comparou os grupos tratados com o extrato e o grupo controle negativo. A medula óssea não apresentou sinais de citotoxicidade nos grupos que receberam o extrato de *V. thapsus*. Assim, os resultados permitiram concluir que o extrato metanólico de *V. thapsus* não contém compostos genotóxicos e citotóxicos.

Espécies do gênero *Pterocaulon* são popularmente utilizadas em tratamentos etnoveterinários devido às suas atividades: antibiótica, antiviral e citotóxica. Pereira et al. (2011) testaram se o extrato hexânico de *Pterocaulon polystachyum* exerce alguma atividade sobre o DNA utilizando o teste do micronúcleo com medula óssea. Os resultados mostraram que, comparando-se

com o grupo controle negativo, o extrato provocou redução significativa ($P < 0,01$) na frequência de eritrócitos micronucleados no grupo tratado com a dose de 400mg kg^{-1} . A frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados em fêmeas foi menor que em machos em todos os grupos de estudo, exceto no grupo tratado com a dose de 400mg kg^{-1} e no grupo controle positivo. Assim, o autor pode inferir que o extrato não produz mutações cromossômicas, porém, foi relativamente tóxico na maior concentração, pois em outros testes realizados (cometa e testes com células hepáticas e renais) evidenciou-se genotoxicidade.

2. OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho foram:

- Avaliar a mutagenicidade de extratos metanólicos e hexânicos de *P. ramiflora* e *P. torta* através de ensaios de mutação gênica reversa com *S. typhimurium* (teste de Ames) utilizando as linhagens TA100, TA102, TA97a e TA98 na presença e na ausência de S9.
- Avaliar a mutagenicidade de extratos metanólicos de *P. ramiflora* e *P. torta* através do ensaio de micronúcleo com células do sangue periférico de camundongos Swiss albinos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Material vegetal

As folhas de *P. torta* e de *P. ramiflora* foram coletadas em dezembro de 2007, no município de São Carlos-SP. A coleta e identificação botânica das

espécies foram realizadas pelo Prof. Dr. Jorge Yoshio Tamashiro do Departamento de Botânica do Instituto de Biologia da Unicamp e as exsiccatas foram depositadas no Herbário da Unicamp, sob número UEC1447 e UEC1448, respectivamente.

Os extratos foram preparados no Instituto de Química da UNESP, Câmpus Araraquara-SP, sob coordenação do Prof. Dr. Wagner Vilegas.

3.2. Teste de Ames

3.2.1 Linhagens utilizadas

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

também detecta mutágenos do tipo *frameshift* e apresenta mutação no gene *his D 6610* e alvo para mutação os resíduos GC (Maron e Ames, 1983).

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

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

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

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

3.2.4 Preparo dos inóculos de *S. typhimurium*

Com auxílio de alça de inoculação, pequena quantidade da cultura estoque congelada foi semeada em 30mL de caldo nutriente (Oxoid® nº 2), incubada a 37°C, por 14 horas em banho-maria sob agitação (160 rpm), de modo a obter uma densidade de $1 - 2 \times 10^9$ bactérias mL⁻¹.

3.2.5 Meios de cultura

Os meios de cultura e soluções necessários para os ensaios de mutação reversa foram preparados de acordo com as especificações de Maron & Ames (1983).

O crescimento das linhagens de *S. typhimurium* foi realizado em caldo nutriente Oxoid® nº 2 e o ágar nutriente elaborado a partir do caldo nutriente, com ou sem ampicilina dependendo do ensaio, solidificado com 1,5% de ágar (Difco®).

Nos ensaios de mutagenicidade foi usado AMG, constituído de ágar, glicose (20 g de glicose, 15 g de Bacto ágar e 930 mL de água destilada) e Meio Vogel Bonner “E” 50x concentrado (10 g de sulfato de magnésio heptahidratado, 100 g de ácido cítrico, 175 g de fosfato de sódio e amônio, 500g de fosfato de potássio dibásico e 670 mL de água destilada) na proporção de 980 mL para 20 mL respectivamente. Para os testes realizados com *S. typhimurium* TA97a o ágar mínimo foi preparado com apenas 0,4% de glicose devido à sensibilidade dessa linhagem ao açúcar.

O ágar de superfície (“top-agar”) é composto de 0,5 g de cloreto de sódio, 0,6 g de Bacto® ágar e 100 mL de água destilada, acrescido de 10 mL de uma solução de L-histidina 0,096 mg mL⁻¹ (Sigma®) e D-biotina 0,123 mg mL⁻¹ (Sigma®).

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

3.2.6 Controles

O controle negativo foi feito com DMSO, o solvente dos extratos vegetais. Os ensaios foram realizados incluindo-se também controles positivos para confirmar as propriedades de reversão e especificidade de cada cepa. Foram utilizados como controle positivo em ensaios sem S9 o NPD para as linhagens TA98 e TA97a, azida sódica para a linhagem TA100 e mitomicina-C para a linhagem TA102 e para os ensaios com S9 foram usados o 2-antramino (TA98, TA100 e TA97a) e o 2-aminofluoreno (TA102).

3.2.7 Preparo da mistura S9

Foi utilizada a fração microssomal S9 homogeneizada de fígado de rato (fração pós-mitocondrial), suplementada com um cofator, preparada a partir de fígado de roedores tratados com agentes indutores de enzimas (aroclor 1254). A fração S9 revela se a substância ou amostra é mutagênica em sua forma original ou necessita ser metabolizada ou ativada para se tornar mutagênica. Essa fração foi obtida da MOLTOX® (Molecular Toxicology, Inc. USA). Para o preparo da mistura S9, todas as soluções (cloreto de magnésio 0,4M e cloreto de potássio 0,4M, glicose-6-fosfato 1M, β -nicotinamida adenina dinucleotídeofosfato 0,1M, tampão fosfato 0,2M pH 7,4 e água destilada) inclusive a fração S9 hidratada, foram mantidas em banho de gelo durante todo o ensaio e preparadas sempre a fresco e utilizadas por um período de no máximo 3 horas.

3.2.8 Realização dos ensaios

Foi empregada a metodologia de pré-incubação, desenvolvida por Maron e Ames (1983). Em tubos de ensaios foram colocados 0,1mL de cultura

de bactérias ($1-2 \times 10^9$ bactérias mL⁻¹), a concentração adequada do extrato e 0,5mL de tampão fosfato pH 7,4 ou 0,5 mL de S9 mix (4%) nos ensaios com ativação metabólica. Os tubos assim compostos foram incubados a 37°C durante 20 minutos. Após esse tempo, foram adicionados 2mL de top-agar acrescidos de uma solução de histidina/biotina 0,05mM na proporção de 10/100mL. Em seguida, os tubos foram agitados e vertidos em placas de Petri contendo AMG. Essas placas foram incubadas por 48 horas a 37°C. Transcorrido esse tempo, foi efetuada a contagem das colônias revertentes. Todas as concentrações testadas, controles positivos e negativos foram realizados em triplicata.

3.2.9 Forma de análise dos resultados

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

A partir dos resultados obtidos, foi calculada a RM para cada dose analisada, que é a média do número de revertentes na placa teste (espontâneos mais induzidos) dividida pela média do número de revertentes por placa do controle negativo. A amostra foi considerada positiva quando a RM foi maior ou igual a 2 em pelo menos uma das doses testadas e quando

houve uma relação dose resposta entre as concentrações testadas e o número de revertentes induzidos. Por sua vez, a amostra foi considerada negativa para o teste de Ames, quando a mesma não induziu aumento significativo no número de revertentes e seus RM foram todos menores que 2. Quando apenas um dos parâmetros for atendido, considerou-se indícios de mutagenicidade.

3.3. Teste do micronúcleo

O protocolo adotado para a realização dos ensaios foi o descrito por Hayashi et al. (1990), no qual se empregam lâminas pré-coradas com laranja de acridina.

3.3.1 Preparo das lâminas

As lâminas adequadamente limpas foram aquecidas a aproximadamente 70°C. Sobre as lâminas quentes, colocou-se 10µL de solução de laranja de acridina (1 mg ml⁻¹) fazendo-se o espalhamento com a extremidade de outra lâmina. As lâminas foram secas ao ar e guardadas em caixa apropriada, a temperatura ambiente, em local escuro, por pelo menos 24 horas.

3.3.2 Animais e doses utilizadas

Para avaliação da mutagenicidade *in vivo* dos extratos, foram empregados camundongos Swiss albinos (machos e fêmeas) jovens com aproximadamente 30g, cuja aprovação do Comitê de Ética encontra-se em anexo sob o protocolo CEP/FCF/CAr 08/2010. Foram avaliadas três doses: 15,0; 11,2 e 7,5 mg kg⁻¹ de peso corporal (p. c.) do extrato metanólico de *P.*

torta e 7,1; 5,3 e 3,6 mg kg⁻¹ p.c. do extrato metanólico de *P. ramiflora* dissolvidos em água e administradas via gavagem. Essas doses foram determinadas a partir do limite de solubilidade dos extratos em água e do volume máximo de solução a ser administrado por animal que correspondeu a 0,3 mL. Com isso a maior dose foi determinada e a partir desta as demais que corresponderam a 75 e 50%. Foi estabelecido um grupo controle positivo para cada uma das espécies vegetais avaliadas quanto à mutagenicidade, no qual os animais foram tratados via intraperitoneal com ciclofosfamida (50 mg kg⁻¹ p.c.). O grupo controle negativo recebeu via gavagem 0,3 ml do solvente empregado, água.

Foram coletadas amostras de sangue da cauda dos animais antes de cada tratamento (T0), obtendo-se assim a frequência basal de micronúcleos para cada indivíduo. Trinta horas depois da administração dos compostos-teste aos animais, foi feita uma nova coleta de sangue para verificação da mutagenicidade aguda dos extratos vegetais através do teste do micronúcleo em células do sangue periférico.

O extrato hexânico não foi avaliado no teste do micronúcleo devido à pouca quantidade de extrato disponível e devido à baixa solubilidade em água.

3.3.3 Obtenção do sangue

Com o auxílio de uma agulha, perfurou-se a cauda do animal, coletou-se 5µL de sangue (uma gota) que foi depositada no centro da lâmina previamente preparada com laranja de acridina e posteriormente coberta com lamínula. As lâminas com o material biológico foram mantidas a -20°C e no

escuro por no mínimo 24 horas antes da análise citológica, propiciando uma melhor ação do corante.

A análise citológica das lâminas contendo o sangue periférico dos animais foi efetuada o mais rápido possível, evitando a deterioração do material. Esta análise foi realizada em microscópio de fluorescência, combinando luz azul (488 nm) e filtro amarelo. Foram contados 2000 reticulócitos por animal e anotadas as frequências de células micronucleadas.

3.3.4 Análise dos Resultados Obtidos

Após a análise citológica das lâminas contendo amostras do sangue periférico dos camundongos tratados com os extratos vegetais, foram calculadas as frequências médias de células micronucleadas, bem como os desvios-padrão para cada um dos grupos de tratamento. A análise estatística foi realizada após a obtenção de todos os resultados. A análise de variância foi feita através do programa “Instat” utilizando o teste de Turkey-Kramer.

4. RESULTADOS

4.1. Teste de Ames

4.1.1. *P. ramiflora*

Com o extrato metanólico, sem S9, os resultados para as linhagens TA100 e TA102 foram considerados negativos. O extrato não induziu aumento significativo do número de revertentes por placa e suas RMs foram todas menores que 2. Com a TA98 o extrato apresentou indícios de mutagenicidade, pois, aumentou significativamente o número de revertentes por placa e as RMs

foram próximas a 2 e para a linhagem TA97a a mutagenicidade foi significativamente aumentada e as RM maiores que 2. Com S9, os resultados para as linhagens TA100, TA102, TA98 e TA97a foram negativos porque não aumentaram significativamente o número de revertentes por placa e suas RMs foram menores que 2 (Tabela 1).

Para o extrato hexânico, sem S9, os resultados para TA100, TA98, TA102 e TA97a foram considerados negativos pois não foram observados aumentos significativos no número de revertentes por placa e suas RMs ficaram abaixo de 2 (Tabela 1). Nessa mesma condição, o extrato hexânico mostrou-se tóxico para a linhagem TA102 sendo, portanto, necessária uma diluição das concentrações empregadas. A Tabela 2 mostra os resultados obtidos frente às novas doses. Verifica-se que não houve aumento significativo da frequência de revertentes e que mesmo com a diminuição das concentrações ainda foi observada toxicidade nas maiores concentrações utilizadas.

Com S9, para este mesmo extrato, os resultados para TA100, TA98, TA97a e TA102 também foram considerados negativos (Tabela 1).

4.1.2. *P. torta*

Para o extrato metanólico, os ensaios sem S9 mostraram mutagenicidade para as linhagens TA97a e TA98. Os valores de RM aumentaram de forma diretamente proporcional à concentração de extrato. Para TA100 o extrato apresentou indícios de mutagenicidade e foram negativos

para a TA102. Os resultados para TA100, TA98, TA97a e TA102 com S9 foram todos negativos (Tabela 3).

Já com o extrato hexânico, com a linhagem TA102 sem S9, constatou-se apenas indícios de mutagenicidade, e negativos para TA100 e TA97a. A linhagem TA98 apresentou mutagenicidade positiva tanto em presença como em ausência de S9. Em presença de S9, a linhagem TA97a e TA102 não apresentaram atividade mutagênica e a TA100 indícios de mutagenicidade (Tabela 3).

Para facilitar a visualização de todos os resultados supracitados, tanto os de *P. ramiflora* quanto os de *P. torta*, foi montada a Tabela 4 que mostra apenas qualitativamente se foi constatada ou não mutagenicidade.

TABELA 1. Atividade mutagênica expressa pela média, desvio padrão e RM do número de revertentes por placa nas linhagens TA 100, TA 98, TA 102 e TA97a de *S. typhimurium* expostas aos extratos metanólico e hexânico de *P. ramiflora*, em várias doses, com e sem S9.

Tratamento	mg/ placa	sem S9						com S9					
		TA100	TA98	TA102	TA97a	TA100	TA98	TA102	TA97a				
DMSO		171 ± 3	24 ± 0	289 ± 8	154 ± 4	153 ± 15	36 ± 12	330 ± 3	214 ± 26				
EXTRATO METANÓLICO	1,25	167 ± 6 (1,0)	25 ± 1 (1,0)	341 ± 22 (1,2)	154 ± 12 (1,0)	120 ± 11 (0,8)	33 ± 6 (0,9)	336 ± 27 (1,0)	217 ± 11 (1,0)				
	2,50	160 ± 23 (0,9)	28 ± 4 (1,2)	323 ± 10 (1,1)	163 ± 16 (1,1)	137 ± 15 (0,9)	28 ± 10 (0,8)	296 ± 16 (0,9)	194 ± 14 (0,9)				
	5,00	171 ± 6 (1,0)	36 ± 5 (1,5)*	390 ± 23 (1,3)	238 ± 32 (1,5)*	142 ± 3 (1,0)	26 ± 4 (0,7)	265 ± 3 (0,8)	234 ± 6 (1,1)				
	7,50	202 ± 14 (1,2)	40 ± 1 (1,7)*	418 ± 11 (1,5)	269 ± 10 (1,8)*	131 ± 19 (0,9)	21 ± 7 (0,6)	280 ± 20 (0,9)	237 ± 4 (1,1)				
	10,00	230 ± 49 (1,4)	35 ± 3 (1,5)*	386 ± 33 (1,3)	314 ± 9 (2,0)**	116 ± 13 (0,8)	27 ± 8 (0,8)	255 ± 14 (0,8)	228 ± 11 (1,1)				
CONTROLE +		1099 ± 102	3520 ± 579	2406 ± 229	2056 ± 186	1989 ± 39	2186 ± 444	1593 ± 12	2599 ± 194				
DMSO		110 ± 12	26 ± 5		143 ± 24	164 ± 22	24 ± 3	191 ± 12	171 ± 7				
EXTRATO HEXÂNICO	0,47	112 ± 7 (1,0)	24 ± 4 (0,9)		151 ± 20 (1,0)	133 ± 14 (0,8)	23 ± 2 (0,9)	175 ± 5 (0,9)	157 ± 14 (0,9)				
	0,94	121 ± 4 (1,0)	24 ± 5 (0,9)		165 ± 25 (1,1)	136 ± 31 (0,8)	25 ± 4 (1,0)	172 ± 16 (0,9)	178 ± 26 (1,0)				
	1,88	131 ± 8 (1,0)	22 ± 1 (0,9)	Vide tabela 2	156 ± 17 (1,1)	129 ± 22 (0,8)	24 ± 8 (1,0)	164 ± 18 (0,8)	162 ± 7 (0,9)				
	3,75	146 ± 5 (1,3)	25 ± 6 (1,0)		185 ± 16 (1,3)	154 ± 26 (0,9)	24 ± 3 (1,0)	161 ± 31 (0,8)	159 ± 12 (0,9)				
	5,63	148 ± 7 (1,3)	21 ± 7 (0,8)		167 ± 16 (1,2)	150 ± 24 (0,9)	32 ± 7 (1,3)	171 ± 12 (0,8)	159 ± 13 (0,9)				
CONTROLE +		2239 ± 121	1393 ± 335		1054 ± 9	2419 ± 352	3120 ± 355	1505 ± 295	3102 ± 138				

Controle + → **Sem S9:** NPD (10 µg/placa) para as linhagens TA98 e TA97a, azida sódica (2,5 µg/placa) para a linhagem TA100 e mitomicina C (0,5 µg/placa) para a linhagem TA102. **Com S9:** 2-antramino (1,25 µg/placa) para TA98, TA100 e TA97a e 2-aminofluoreno (10 µg/placa) para TA102. *ANOVA (P < 0,05), **ANOVA (P < 0,01). DMSO = 75 µL/placa.

TABELA 2. Atividade mutagênica expressa pela média, desvio padrão e RM do número de revertentes por placa na linhagem TA102 de *S. typhimurium* exposta ao extrato hexânico de *P. ramiflora*, em várias doses, sem S9.

Tratamento	mg/placa	TA102
DMSO		142 ± 10
	0,05	181 ± 21 (1,2)
	0,11	106 ± 16 (0,7)
EXTRATO HEXÂNICO	0,23	115 ± 8 (0,8)
	0,47	94 ± 13 (0,6)
	0,94	77 ± 4 (0,5)
CONTROLE POSITIVO*		1512 ± 153

*Mitomicina C (0,5 µg/placa), DMSO= 75µL/placa

TABELA 3. Atividade mutagênica expressa pela média, desvio padrão e RM do número de revertentes por placa nas linhagens TA 100, TA 98, TA 102, TA 97a e TA 97a com S9

Tratamento	mg/ placa	sem S9					com S9				
		TA100	TA98	TA102	TA97a	TA100	TA98	TA102	TA97a	TA97a	
DMSO		142 ± 6	18 ± 7	121 ± 13	150 ± 6	201 ± 14	30 ± 5	241 ± 14	170 ± 12		
	0,62	147 ± 7 (1,0)	19 ± 2 (1,0)	136 ± 18 (1,1)	159 ± 25 (1,0)	197 ± 20 (0,9)	24 ± 3 (0,8)	266 ± 15 (1,1)	155 ± 11 (0,9)		
	1,25	180 ± 26 (1,3)	28 ± 4 (1,5)*	128 ± 8 (1,0)	181 ± 12 (1,2)	193 ± 26 (0,9)	28 ± 5 (0,9)	261 ± 17 (1,0)	181 ± 12 (1,0)		
	2,50	228 ± 37 (1,6)*	32 ± 5 (1,7)*	118 ± 15 (1,0)	208 ± 14 (1,4)	201 ± 8 (1,0)	22 ± 2 (0,7)	258 ± 10 (1,0)	153 ± 19 (0,9)		
	5,00	218 ± 14 (1,5)*	49 ± 1 (2,7)**	129 ± 6 (1,1)	344 ± 30 (2,3)**	198 ± 4 (0,9)	22 ± 3 (0,7)	247 ± 16 (1,0)	193 ± 23 (1,1)		
CONTROLE +	7,50	155 ± 86 (1,0)	25 ± 4 (1,3)	131 ± 7 (1,1)	363 ± 30 (2,4)**	176 ± 15 (0,8)	22 ± 5 (0,7)	232 ± 22 (0,9)	199 ± 26 (1,1)		
		1629 ± 332	492 ± 69	835 ± 224	1255 ± 291	2119 ± 413	540 ± 51	969 ± 576	1330 ± 706		
	DMSO	139 ± 9	22 ± 5	151 ± 18	310 ± 9	134 ± 5	26 ± 3	215 ± 50	200 ± 19		
	0,62	146 ± 9 (1,0)	25 ± 4 (1,1)	98 ± 13 (0,6)	286 ± 21 (0,9)	140 ± 13 (1,0)	31 ± 5 (1,1)	261 ± 11 (1,2)	188 ± 31 (0,9)		
	1,25	162 ± 8 (1,1)	24 ± 2 (1,0)	139 ± 38 (0,9)	231 ± 18 (0,7)	120 ± 14 (0,9)	26 ± 4 (1,0)	239 ± 8 (1,1)	186 ± 27 (0,9)		
EXTRATO HEXÂNICO	2,50	121 ± 6 (0,9)	33 ± 4 (1,5)*	176 ± 36 (1,1)	160 ± 15 (0,5)	152 ± 27 (1,1)	33 ± 1 (1,3)	214 ± 24 (0,9)	171 ± 9 (0,8)		
	5,00	102 ± 14 (0,7)	36 ± 6 (1,6)*	233 ± 42 (1,5)*	145 ± 20 (0,5)	217 ± 11 (1,6)*	63 ± 11 (2,4)**	213 ± 9 (0,9)	227 ± 9 (1,1)		
	7,50	119 ± 19 (0,8)	44 ± 4 (2,0)**	240 ± 90 (1,6)*	177 ± 22 (0,6)	209 ± 39 (1,6)*	91 ± 3 (3,5)**	161 ± 17 (0,7)	129 ± 30 (0,6)		
	CONTROLE +	1805 ± 302	467 ± 319	712 ± 580	1264 ± 749	2419 ± 1017	485 ± 107	999 ± 108	947 ± 171		

Controle + → **Sem S9:** NPD (10 µg/placa) para as linhagens TA98 e TA97a; azida sódica (2,5 µg/placa) para a linhagem TA100 e mitomicina-C (0,5 µg/placa) para a linhagem TA102. **Com S9:** 2-antramino (1,25 µg/placa) para TA98, TA100 e TA97a e 2-aminofluoreno (10 µg/placa) para TA102.

*ANOVA (P < 0,05), **ANOVA (P < 0,01). DMSO = 75µL/placa

TABELA 4. Resultado da avaliação da mutagenicidade dos extratos analisados com as linhagens TA97a, TA98, TA100 e TA102 de *S. typhimurium* com e sem S9.

ESPÉCIE	<i>Pouteria ramiflora</i>						<i>Pouteria torta</i>						
	METANÓLICO		HEXÂNICO		METANÓLICO		HEXÂNICO		METANÓLICO		HEXÂNICO		
EXTRATO	TA97a	TA100	TA98	TA102	TA97a	TA100	TA98	TA102	TA97a	TA100	TA98	TA100	TA102
COM S9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+/-
SEM S9	+	+/-	-	-	-	-	+	+/-	-	-	+	-	+/-

+: mutagênico; **-**: não-mutagênico; **+/-**: indícios de mutagenicidade

4.2. Teste do micronúcleo

De acordo com a análise citológica realizada, pode-se construir a Tabela 5, que dispõe o número de eritrócitos micronucleados por animal antes do tratamento ($t = 0h$), construída para fins de controle, e a Tabela 6 que dispõe o número de eritrócitos micronucleados encontrados por animal 30 horas após o tratamento com os extratos de *P. torta* e *P. ramiflora* e seus controles.

O teste do micronúcleo evidenciou, após a análise estatística ANOVA – Teste de Turkey-Kramer, que houve aumento significativo ($P < 0,001$) na frequência de eritrócitos micronucleados em todas as doses administradas do extrato de *P. torta*, quando comparados ao controle negativo. Constatou-se ainda que, comparando-se os grupos de tratamento de *P. torta* entre si, a frequência de eritrócitos micronucleados só apresentou diferença significativa ($P < 0,01$) quando comparou-se a maior e a menor dose de extrato administradas, ou seja, os extratos interferem na liberação medular de eritrócitos micronucleados com um comportamento dose-independente.

Para o extrato de *P. ramiflora* observou-se aumento significativo ($P < 0,001$) na frequência de eritrócitos micronucleados apenas quando comparou-se as doses $7,1$ e $5,3\text{mg Kg}^{-1}$ p.c. com o controle negativo, sendo que na comparação entre a dose de $3,6\text{mg kg}^{-1}$ p.c. e o controle negativo não houve aumento significativo ($P > 0,05$). E, comparando-se o aumento da frequência dentre as doses administradas de *P. ramiflora*, somente a comparação entre as doses $7,1$ e $5,3\text{mg kg}^{-1}$ p.c. apresentou aumento significativo ($P < 0,01$),

sugerindo comportamento dose-independente, da mesma maneira observada nos ensaios de *P. torta*.

E ainda, o perfil da frequência de eritrócitos micronucleados encontrados no sangue periférico dos animais antes do tratamento ($t = 0h$) foi considerado normal e o controle positivo (Ciclofosfamida) induziu um aumento significativo ($P < 0,001$) nessa frequência quando comparado ao controle negativo, como era esperado.

Tabela 5. Número de eritrócitos micronucleados por animal antes do tratamento.

Animais										MÉDIA	SD
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
1	1	0	0	2	1	2	2	4	1	1,4	1,22
3	1	1	2	1	3	5	1	1	2	2,0	1,36
1	1	0	1	2	1	3	1	2	2	1,4	0,88
2	2	1	3	0	1	1	1	2	4	1,7	1,20
1	2	1	1	1	0	2	3	1	1	1,3	0,60
3	4	2	1	3	2	1	1	1	2	2,0	1,05
2	0	4	3	3	2	4	1	0	0	1,9	1,66
1	0	0	2	1	1	2	2	3	1	1,3	0,97

Foram analisados 2000 reticulócitos por animal.

Tabela 6. Número de eritrócitos micronucleados por animal 30h após tratamento com

os extratos.

	TRATAMENTO (mg/Kg P.C.)	animais										MÉDIA	SD
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
	C +	101	9 8	9 2	105	97	9 8	9 9	100	96	102	98,8*	3,74
	C -	3	1	2	4	2	3	1	2	0	3	2,1	1,27
<i>P. torta</i>	15	12	8	1 0	13	9	1 1	1 3	8	15	12	11,1***	2,19
	11,2	7	9	1 1	10	ND	9	8	10	7	8	8,78**	1,41
	7,5	6	4	8	9	12	5	1 0	7	6	5	7,20***	2,68
<i>P. ramiflora</i>	7,1	7	8	7	9	6	8	7	6	7	9	7,40**	1,01
	5,3	5	6	6	4	7	5	6	7	5	3	5,40**	1,20
	3,6	2	0	1	3	1	4	2	2	ND	ND	1,88*	1,35

C+ (Controle positivo): Ciclofosfamida 50mg/Kg P.C.; C- (Controle negativo): água destilada; ND: Não Determinado; SD: Desvio Padrão; *P < 0,001 (significativo); **P > 0,05 (não significativo); *P < 0,01 (significativo).

5. DISCUSSÃO

Hoje em dia observa-se um grande interesse, não só da comunidade científica, mas também da população, em utilizar cada vez mais produtos de origem natural. Isso pode ser devido ao fato de que a maioria das pessoas acredita que produtos de origem natural são saudáveis, seguros e incapazes de trazer malefícios, mesmo porque todos sabem que a maioria dos medicamentos industrializados é, todo ou em parte, de origem natural (Silva et al. 2010).

Esses conhecimentos populares devem ser preservados e são de alta relevância no momento da escolha de novos alvos para estudos científicos, pois mostram o potencial farmacológico que as plantas medicinais apresentam.

Muitas destas plantas já foram alvos de estudos farmacológicos que confirmaram a presença de compostos capazes de tratar muitas doenças.

Um bom exemplo disso é o estudo desenvolvido por Mueller et al. (2004) que, à luz de conhecimentos populares e até mesmo indígenas, testaram a atividade de *Artemisia annua* contra a malária e confirmou este fato, ou seja, foi confirmada a presença de um composto químico, a artemisina, capaz de atuar efetivamente no controle dos sintomas da malária. Contra esta mesma enfermidade, Montenegro et al. (2006) confirmaram a atividade do extrato etanólico e fração hidroetanólica de *Pouteria venosa* contra o *Plasmodium berghei*, sendo que o extrato mostrou-se capaz de reduzir a infecção em ratos.

Abe et al. (2002) confirmaram a atividade de *Pouteria sapota* contra a doença de Chagas. Através de testes *in vitro* observaram a capacidade tripanocida contra a forma epimastigota do extrato metanólico de *P. sapota* na dose de 2mg ml⁻¹, confirmando mais uma vez a sabedoria popular.

Estudos recentes sobre o gênero *Pouteria* mostram que é composto basicamente por triterpenos de cadeia longa ou em forma de ésteres de acetato, hidrocarbonetos de cadeia longa, álcoois, ésteres e flavonóides, compostos estes responsáveis pelas atividades biológicas: anti-oxidante, anti-inflamatória, atividade anti-nociceptiva, anti-bacteriana, anti-fúngica, antagonismo ao receptor β de estrógeno e indução de aglutinação de eritrócitos de ratos, coelhos e humanos (Silveira et al., 2009).

Por outro lado, alguns estudos reforçam que além dos compostos de ação benéfica, muitos outros compostos presentes em plantas podem ser

tóxicos, genotóxicos e carcinogênicos quando utilizados em longo prazo, fato que a população desacredita (Silva et al. 2010 e Santos, 2006).

Segundo Elvin-Lewis (2001), vários problemas podem estar associados ao consumo de plantas medicinais por longos períodos, podendo-se citar plantas utilizadas como laxativos (*Senna alexandrina*, *Aloe vera* e *Rhamnus frangula*), que estão relacionadas a dores abdominais e problemas cardíacos, plantas utilizadas como estimulantes (*Areca catechu*, *Ephedra sinica* e *Paullinia cupana*), que estão relacionadas com disfunções hepáticas, agitação, palpitações e insônia. E ainda, de acordo com Ames (1983), muitas plantas apresentam em sua constituição compostos químicos que podem ser citotóxicos ou genotóxicos, podendo até mesmo estar relacionados ao desenvolvimento de tumores.

Alves et al. (2008) avaliaram os efeitos genotóxico da planta medicinal *Physalis angulata*, cujos diferentes extratos e infusões são comumente utilizados na medicina popular para o tratamento da malária, asma, hepatite, dermatites e reumatismo. Linfócitos tratados com *P. angulata* nas concentrações de 3,0 e 6,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$, em meio de cultura apresentaram um aumento estatisticamente significativo na frequência de micronúcleos ($P < 0,05$), demonstrando o efeito mutagênico de *P. angulata* em linfócitos humanos *in vitro*.

Kocaman et al. (2011) utilizaram a metodologia do micronúcleo com linfócitos humanos para avaliar a genotoxicidade do 4-tujanol, um álcool monoterpeneo bicíclico presente no óleo essencial de muitas plantas medicinais e aromáticas como *Laurus nobilis*, *Sideritis erythrantha* e *Achillea millefolium*. O

4-tujanol é muito utilizado como fragrância em xampus, sabonetes e detergentes, como edulcorante em alguns alimentos e bebidas. Os resultados mostraram que houve aumento significativo ($P < 0,01$) na frequência de linfócitos micronucleados 48 horas após o tratamento na ausência da fração S9.

O presente trabalho evidenciou que, em detrimento das tantas atividades benéficas já confirmadas, *P. ramiflora* e *P. torta* possuem compostos genotóxicos, pois os resultados do teste de Ames sugerem a presença de compostos indutores de mutações do tipo *frameshift*, mecanismo de reversão observado nas linhagens TA97a e TA98. E não se pode descartar a possibilidade da presença de outros compostos lesivos que atuem induzindo mutações do tipo substituição de base nitrogenada e *cross-link* que são os mecanismos de reversão observados nas linhagens TA100 e TA102, respectivamente, pois, observaram-se indícios de mutagenicidade nos ensaios realizados com essas linhagens.

Somando-se a este resultado *in vitro*, o teste do micronúcleo (*in vivo*) também sugere a presença de compostos mutagênicos em ambas as espécies, pois os extratos provocaram aumento na frequência de células micronucleadas. Isso demonstra que nos extratos podem estar presentes substâncias que podem levar células em mitose a aneuploidia ou clastogenicidade, ou seja, os extratos podem gerar eventos que podem ocasionar alterações genéticas permanentes nas células. Estes eventos podem representar os passos iniciais de uma neoplasia.

No entanto, não existem estudos detalhados que caracterizem as propriedades toxicológicas de substâncias isoladas dos extratos avaliados, logo

não se pode dizer quais substâncias são responsáveis pelos efeitos mutagênicos observados, pois não existem ainda evidências científicas que comprovem tal fato.

Assim, para elucidar essa incerteza estudos de toxicidade e genotoxicidade de plantas medicinais, bem como de substâncias delas isoladas, são extremamente importantes, pois são fontes de medicamentos fitoterápicos muito comuns hoje em dia, e de acordo com a Resolução nº 90 de 2004 da ANVISA todo medicamento fitoterápico deve ser avaliado quanto à sua toxicidade aguda ou por doses repetidas, bem como quanto à genotoxicidade. Para a avaliação da genotoxicidade, caso os fitoterápicos sejam utilizados em tratamentos de longa duração, a ANVISA determina que sejam empregados os testes de Ames e do micronúcleo.

Pode-se então afirmar que as plantas medicinais alvo desses estudos não devem ser de uso corriqueiro da população, e que outros ensaios devem ser realizados utilizando outros sistemas teste e, aliado a isso, o estudo fitoquímico das espécies, visando elucidar quais são as substâncias causadoras da atividade mutagênica observada e possivelmente isolá-las do extrato complexo, buscando purificar as substâncias responsáveis por tantos efeitos benéficos já comprovados e assim possibilitar a produção de novos medicamentos a partir dessas plantas medicinais.

6. CONCLUSÕES

De acordo com os dados reunidos no presente trabalho, pode-se concluir que:

- Os extratos metanólicos e hexânicos de *P. torta* e *P. ramiflora* foram mutagênicos *in vitro*, pois induziram mutações pontuais no DNA de *S. tiphymurium*;
- Os extratos metanólicos de *P. torta* e *P. ramiflora* foram mutagênicos *in vivo*, pois aumentaram a frequência de células micronucleadas no sangue periférico de camundongos Swiss albinos;
- O uso dessas plantas medicinais deve ser feito com muita cautela;
- Seria muito interessante testar a atividade desses extratos, bem como de substâncias dele isoladas, contra células tumorais.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, F.; NAGAFUJI, S.; YAMAUCHI, T.; OKABE, H.; MAKI, J.; HIGO, H.; AKAHANE, H.; AGUILAR, A.; JIMÉNEZ-ESTRADA, M.; REYES-CHILPA, R. Trypanocidal constituents in plants. Evaluation of Some Mexican plants for their trypanocidal activity and active constituents in guaco, roots of *Aristolochia taliscana*. **Biol Pharm Bull**, v. 25, p. 1188-1191, 2002.

[ALVES RS](#), [CABRAL TR](#), [CABRAL IR](#), [ANTUNES LMG](#), [ANDRADE CP](#), [CARDOSO PCS](#), [BAHIA MO](#), [PESSOA C](#), [NASCIMENTO JLM](#), [BURBANO RR](#), [TAKAHASHI CS](#). Genotoxic effect of *Physalis angulata* L. (Solanaceae) extract on human lymphocytes treated in vitro. **Biocell**, v.32, p.195-200, 2008.

ALVES, C. Contribuição ao estudo químico e biológico de *Pouteria gardnerii*, Brasília, **Dissertação de Mestrado**, Universidade de Brasilia 2007.

AMARQUAYE, A.; CHE, C. T.; BEJAR, E.; MALONE, M. H.; FONG, H. H. S. A new glycolipid from *Byrsonima Crassifolia*. **Planta Med.**, v. 60, p. 85-86, 1994.

ANVISA. Determina a publicação do “Guia para a realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos”, **Resolução n. 90 de 16 de março de 2004**. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/re_90_guia_tox.pdf>. Acesso em: 20 de agosto de 2010.

BERNSTEIN, L.; KALDOR, J.; McCANN, J.; PIKE, M. C. An empirical approach to the statistical analysis of mutagenesis data from the Salmonella Test. *Mutation Research*, v. 4, p. 81-267, ago 1982.

BOLETI, A. P. A.; FREIRE, M. G.; COELHO, M. B.; SILVA, W.; BALDASSO, P. A.; GOMES, V. M.; MARANGONI, S.; NOVELLO, J. C.; MACEDO, M. L. Insecticidal and antifungal activity of a protein from *Pouteria torta* seeds with lectin-like properties. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 55, p. 2653-2658, 2007.

BOLETI, A. P. A.; VENTURA, C. A.; JUSTO, G. Z.; SILVA, R. A.; SOUSA, A. C. T.; FERREIRA, C. V.; YANO, T.; MACEDO, M. L. R. Pouterin, a novel potential cytotoxic lectin-like protein with apoptosis-inducing activity in tumorigenic mammalian cells. **Toxicon**, v. 51, p. 1321-1330, 2008.

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

CHERDSHEWASART, W.; SUTJIT, W.; PULCHAROEN, K.; CHULASIRI, M. The mutagenic and antimutagenic effects of the traditional phytoestrogen-rich herbs, *Pueraria mirifica* and *Pueraria lobata*, **Brazilian Journal of Medical and Biological research**, v. 42, p. 816-823, 2009.

DE SÁ FERREIRA, I.C.F.; VARGAS, V.M.F. Mutagenicity of medicinal plant extracts in *Salmonella*/microsome assay. **Phytotherapy Research**, v. 13, p. 397–400, 1999.

DEARFIELD, K. L.; CIMINO, M. C.; MCCARROLL, N. E.; MAUER, I.; VALCOVIC, L. R. Genotoxicity risk assessment: a proposed classification strategy. **Mutation Research**, v. 521, p. 121-135, nov. 2002.

DÉCIGA-CAMPOS, M.; RIVERO-CRUZ, I.; ARRIAGA-ALBA, M.; CASTAÑEDA-CORRAL, G.; ANGELES-LÓPEZ, G.E.; NAVARRETE, A.; MATA, R. Acute toxicity and mutagenic activity of Mexican plants used in traditional medicine. **J Ethnopharmacol**, v. 110, p. 334–342, 2007.

DECORDIER, I.; KIRSCH-VOLDERS, M.; PLAS, G.; ELHAJOUJI, A.; LUKAMOWICZ, M.; GONZALEZ, L.; LOOCK, K. V. The in vitro MN assay in 2011: origin and fate, biological significance, protocols, high throughput methodologies and toxicological relevance. **Arch. Toxicology**, v. 85, p. 873-899, 2011.

DEVIENNE, K. F.; RADDI, M. S. G.; POZETTI, G. L. Das plantas medicinais aos fitofarmacos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.6, p. 11-14, 2004.

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

ESCOBAR, F. M.; SABINI, M. C.; ZANON, S. M.; CARIDDI, L. N.; TONN, C. E.; SABINI, L. I. Genotoxic evaluation of a methanolic extract of *Verbascum Thapsus* using micronucleus test in mouse bone marrow. **Natural Product Communications**, v. 6, p. 989-991, 2011.

FENECH, M.; KIRSCH-VOLDERS, M.; NATARAJAN, A. T.; SURRALES, J.; CROFT, J.; PARRY, J.; NORPPA, H. Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in human cells. **Mutagenesis**, v. 26, p. 125–132, 2011.

FONTES-JÚNIOR, E. A.; SOUZA, P. J. C.; NASCIMENTO, J. L. M.; SANTOS, S. N.; ESPÍNDOLA, L. S.; FERREIRA, V. M. M. Antinociceptive and antiinflammatory properties of ethanolic extract of *Pouteria ramiflora* roots, **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 28, p. 812-818, 2009.

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

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS. **Plantas Mediciniais**. Disponível em: <http://www.ibama.gov.br/flora/plantas_mediciniais.htm> , acesso em 09 de Abril de 2009.

JOLY, A. B. **Botânica: introdução à taxonomia vegetal**. São Paulo: Editora Nacional, 1998, 407p.

KIRSCH-VOLDERS, M.; DECORDIER, I.; ELHAJOUJI, A.; PLAS, G.; AARDEMA, M.J.; FENECH, M. In vitro genotoxicity testing using the micronucleus assay in cell lines, human lymphocytes and 3D skin models. **Mutagenesis**, v. 26, p. 177–184, 2011.

KIRSCH-VOLDERS, M.; VANHAUWAERT, A.; DE BOECK, M.; DECORDIER, I. Importance of detecting numerical versus structural chromosome aberrations. **Mutation Research**, v. 504, p. 137–148, 2002.

KOCAMAN, A. Y.; RENCUZOGÜLLARI, E.; TOPAKTAS, M.; ISTIFLI, E. S.; BÜYÜKLEYLA, M. The effects of 4-thujanol on chromosome aberrations, sister chromatid exchanges and micronucleus in human peripheral blood lymphocytes. **Cytotechnology**, DOI 10.1007/s10616-011-9372-7, 2011.

KONAN, N. A.; BACCHI, E. M. Antiulcerogenic effect and acute toxicity of a hidroethanolic extract from the cashew (*Anacardium occidentale* L.) leaves. **Journal of Ethno-Pharmacology**, v. 112, p. 237-242, 2007.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 2.ed. São Paulo: Instituto Plantanarum, 1998. 352p.

LYNCH, B.; SIMON, R.; ROBERTS, A. In vitro and in vivo assessment of the genotoxic activity of aloesin. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, 2011.

MA, J.; YANG, H.; BASILE, M. J.; KENNELLY, E. J. Analysis of polyphenolic antioxidants from the fruits of three *Pouteria* species by selected ion monitoring liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 52, p. 5873-5878, 2004.

MANOSROI, A.; SARAPHANCHOTIWITTHAYA, A.; MANOSROI, J. Effects of *Pouteria cambodiana* extracts on in vitro immunomodulatory activity of mouse immune system. **Fitoterapia**, v. 77, p. 189-193, 2006.

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

MATEUCA, R.; LOMBAERT, N.; AKA, P.V.; DECORDIER, I., KIRSCH-VOLDERS, M. Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring. **Biochimie**, v. 88, p. 1515–1531, 2006.

MOHD-FUAT, A.R.; KOFI, E.A.; ALLAN, G.G. Mutagenic and cytotoxic properties of three herbal plants from Southeast Asia. **Trop Biomed**, v. 24, p. 49–59, 2007.

MONTENEGRO, L. H. M.; OLIVEIRA, P. E. S.; CONSERVA, L. M.; ROCHAM, E. M. M.; BRITO, A. C.; ARAÚJO, R. M.; TREVISAN, M. T. S.; LEMOS, R. P. L. Triterpenóides e avaliação do potencial antimalárico, larvicida, anti-radicalar e anticolinesterástico de *Pouteria venosa* L (Sapotaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 611-617, 2006.

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

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

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Tradicional Medicine**. Disponível em: <http://www.who.int/medicines/areas/traditional/definitions/en/index.html>, acesso em 09 de Abril de 2009.

PEILER, E. Pouteria: fruits for the future. International Center for underutilized crops, v. 11, 2004.

PEREIRA, P.; REGNER, G. G.; GIANESINI, J.; VON-BOROWSKI, R. G.; SILVEIRA, F.; SEMEDO, J. G.; FERRAZ, A. B. F.; WILLAND, E.; VON-POSER, G.; ALLGAYER, M.; PICADA, J. N. Toxicological evaluation of *Pterocaulon polystachium* extract: A medicinal plant with antifungal activity. **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 31, p. 242-249, 2011.

PERFEITO, J. P.; SANTOS, M. L.; LOPEZ, K. S. E.; PAULA, J. E.; SILVEIRA, D. Characterization and biological properties of *Pouteria torta* extracts: a

preliminary study, **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, 15(3): 183-186, Jul. 2005.

SANTOS, F. V. Avaliação da mutagenicidade in vivo e in vitro de compostos obtidos de plantas nativas do cerrado, **Tese de Doutorado**, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” – UNESP, 2006.

SILVA, C. J.; BASTOS, J. K.; TAKAHASHI, C. S. Evaluation of the genotoxic and cytotoxic effects of crude extracts of *Cordia ecalyculata* and *Echinodorus grandiflorus*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 127, p. 445-450, 2010.

SILVA, J. C.; BASTOS, J. K.; TAKAHASHI, C. S. Evaluation of the genotoxic and cytotoxic effects of crude extracts of *Cordia ecalyculata* and *Echinodorus grandiflorus*. **Journal of Etnopharmacology**, v.127, p.445-450, out 2009.

SILVEIRA, D.; SILVA, C. A. M.; SIMEONI, L. A. Genus Pouteria: Chemistry and Biological activity, **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 19(2A), p. 501-509, 2009.

SWENSON U.; ANDERBERG, A. A. Phylogeny, character evolution, and classification of Sapotaceae (Ericales). **Cladistics**, v. 21, p. 101-130, 2005.

VERSCHAEVEA. L.; STADENC, J. V. Mutagenic and antimutagenic properties of extracts from South African tradicional medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 119, p. 575-587, 2008.

VINOD, V.; TIWARI, P. K.; MESHRAM, G. P. Evaluation of mutagenic and antimutagenic activities of neem (*Azadirachta indica*) seed oil in the *in vitro*



Ames Salmonella/microsome assay and *in vivo* mouse bone marrow micronucleus test. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 134, p. 931-937, 2011.

DECLARAÇÃO

8. ANEXO Declaro que o Protocolo para uso de Animais em Pesquisa intitulado "Ensaio de micronúcleo para avaliação da atividade mutagênica de *Pouteria torta* e *Pouteria ramiflora*"; apresentado pela acadêmica de Iniciação Científica Juliana Ferreira de Sousa, do curso de graduação em Farmácia-Bioquímica, sob orientação da Professora Doutora Eliana Aparecida Varanda, do Departamento de Ciências Biológicas desta Faculdade, foi submetido à análise do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da UNESP em 08 de abril de 2010 recebendo o protocolo CEP/FCF/CAr. 08/2010.

Araraquara, 08 de abril de 2010.



Kátia T. Canozza Rocha

Secretária do Comitê de Ética em Pesquisa