

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE ARARAQUARA

Paula Karina Boldrin

**Avaliação das atividades mutagênica, pró-inflamatória e
estrogênica de *Machaerium hirtum* e *Crotalaria pallida***

Orientadora: Prof^a Dr^a Eliana Aparecida Varanda

Araraquara
2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE ARARAQUARA

Paula Karina Boldrin

**Avaliação das atividades mutagênica, pró-inflamatória e
estrogênica de *Machaerium hirtum* e *Crotalaria pallida***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia, área de concentração: Mutagênese, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia.

Orientadora: Prof^a Dr^a Eliana Aparecida Varanda

Araraquara
2013

Ficha Catalográfica

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

B687a Boldrin, Paula Karina
Avaliação das atividades mutagênica, pró-inflamatória e estrogênica de
Machaerium hirtum e *Crotalaria pallida* / Paula Karina Boldrin. –
Araraquara, 2013
147 f.

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

1. Mutagenicidade. 2. Estrogenicidade. 3. *Machaerium hirtum*. 4.
Crotalaria pallida. I. Varanda, Eliana Aparecida, orient. II. Título.

CAPES: 40300005

“Aos meus pais e à minha querida irmã, por sempre me apoiarem e acreditarem em minha capacidade, dando-me não apenas o suporte financeiro, mas especialmente todo o alicerce emocional e o amor infinito para que pudesse chegar até aqui. A vocês, dedico este trabalho”.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, acima de tudo, a Deus, pelo seu amor e cuidado para com seus filhos e por ter me dado sabedoria para que eu pudesse concluir mais esta etapa da minha vida;

À Professora Eliana Aparecida Varanda, por ter aceitado me orientar e confiado em meu trabalho. Agradeço pela paciência e por todos os ensinamentos passados, tanto pessoais quanto profissionais. Obrigada por se mostrar sempre disponível e solidária. Foi um privilégio poder fazer parte do seu grupo de pesquisa;

À Professora Alexandra Ivo de Medeiros por ceder o Laboratório de Imunologia para a realização dos ensaios para a quantificação de prostaglandina e por todo o aprendizado que pude obter durante nossas conversas. Além disso, agradeço aos alunos Felipe e Thaís por todo auxílio prestado para que as análises imunológicas fossem realizadas;

Às Professoras Denise Crispim Tavares e Lusânia Maria Greggi Antunes, por aceitarem compor a Banca Examinadora do Exame de Qualificação, sendo as sugestões enriquecedoras para este trabalho;

Aos queridos amigos que ganhei quando comecei a fazer parte do Laboratório de Mutagênese, Ana, Flávia, Mariana, Aline, Catarine, Márcio e Rone. Também agradeço a uma amiga muito especial que fiz durante a graduação e tive o privilégio de continuar tendo o prazer da companhia durante o Mestrado, Lívia. Foi um prazer trabalhar com todos vocês.

Às amigas que fiz durante as disciplinas da pós-graduação, Tere, Paula e Fabi, por quem tenho um carinho muito especial. E também aos amigos que foram essenciais durante meu período em Araraquara, Priscila, Linda, Paulo, Guga, Simone, André, Bruno e Ni;

Às amigas de sempre, que participaram e participam de todas as etapas da minha vida, dando-me todo suporte e carinho, Camila, Laís, Talita, Cibele e Luci. Obrigada por se fazerem presentes mesmo quando estávamos distantes;

À minha linda família, por todo amor e aconchego que me dão. Vocês são precisos pra mim sendo meu apoio em todos os momentos. Agradeço à vovó e ao vovô, por se orgulharem tanto de mim. Aos meus tios, primos e principalmente ao meu pai e a minha mãe, por acreditarem em mim e tornarem real meu sonho de graduação e pós-graduação. Um agradecimento especial à minha irmã, a qual tenho como segunda mãe, por me fazer sentir tão amada. Eu amo vocês.

À família Gonçalves, Maria José, Wladimir, Aline e Tiago, por me acolherem com tanto carinho. Deus foi maravilhoso colocando-os em meu caminho.

Ao meu amor e melhor amigo, Tiago, por me fazer querer sempre ser uma pessoa melhor. Por todos os ensinamentos e todo cuidado comigo. Obrigada por trazer mais leveza à minha vida.

Você é uma benção pra mim. Eu amo você!

À Margarete, funcionária sempre acessível e às técnicas do Laboratório de Microbiologia, Néia, Marisa e especialmente à Sílvia e à Silvinha, por serem sempre tão prestativas. Também agradeço os ensinamentos e as nossas agradáveis conversas;

Às funcionárias da seção de pós-graduação, pela orientação e atenção que sempre me foi dada;

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

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior) e à FAPESP (Fundação e Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pela concessão das bolsas de estudo;

A todos aqueles que de alguma forma colaboraram com a concretização desse trabalho e cujos nomes não foram citados aqui. Muitíssimo obrigada!

Sumário

Resumo

Abstract

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

1. INTRODUÇÃO	23
1.1. Interesse crescente no estudo de plantas.....	23
1.2. Família Fabaceae.....	26
1.3. Gênero <i>Machaerium</i>	27
1.4. Gênero <i>Crotalaria</i>	29
1.5. Atividade mutagênica.....	31
1.5.1. <i>Teste de Ames para determinação da atividade mutagênica</i>	32
1.6. Envolvimento de COX-2 em processos cancerígenos.....	33
1.7. Atividade estrogênica.....	35
1.7.1. <i>Ensaio de estrogenicidade in vitro- RYA</i>	37
2. OBJETIVOS	39
2.1. Objetivos gerais	39
2.2. Objetivos específicos	39
3. MATERIAIS e MÉTODOS	40
3.1. Obtenção do material vegetal.....	40
3.2. Coleta e preparo do material vegetal.....	40

3.2.1. Coleta de Folhas de <i>Machaerium hirtum</i>	40
3.2.2. Preparação do extrato de folhas de <i>M. hirtum</i>	40
3.2.3. Preparação do extrato de caule de <i>M. hirtum</i>	41
3.2.4. Coleta de Flores, folhas, semente e pericarpo de <i>Crotalaria pallida</i>	42
3.2.5. Preparação dos extratos brutos de <i>C. pallida</i>	42
3.2.6. Perfil cromatográfico dos extratos EtOH de <i>C. pallida</i>	43
3.2.7. Fracionamento e purificação do extrato das folhas de <i>C. pallida</i>	43
3.2.7.1. Caracterização e extração de alcaloides pirrolizidínicos.....	44
3.2.7.2. Identificação do estigmasterol.....	45
3.3. Avaliação da mutagenicidade (Teste de Ames).....	47
3.3.1. Obtenção das linhagens utilizadas.....	47
3.3.2. Genótipo das linhagens de <i>S. typhimurium</i>	47
3.3.3 Especificidade da sequência de DNA das linhagens.....	48
3.3.4. Manutenção e estoque das cepas de <i>S. typhimurium</i>	49
3.3.5. Preparo dos inóculos de <i>S. typhimurium</i>	49
3.3.6. Meios de cultura e soluções.....	49
3.3.7. Controles.....	50
3.3.8. Ensaio com ativação metabólica (fração S9).....	50
3.3.9. Realização dos ensaios de mutagenicidade.....	50
3.3.10. Análise dos resultados.....	51
3.4. Ensaio para verificação da associação de processo inflamatório à mutagênese.....	52
3.4.1. Manutenção de linhagens celulares.....	52
3.4.2. Meio e soluções utilizadas.....	52
3.4.3. Coleta e contagem das células.....	53
3.4.4. Atividade citotóxica.....	53
3.4.5. Quantificação de óxido nítrico (NO).....	54
3.4.6. Quantificação dos níveis de PGE-2.....	55
3.5. Avaliação do potencial estrogênico.....	56
3.5.1. Linhagens e plasmídeos utilizados.....	56

3.5.2. Meios de cultura e soluções.....	56
3.5.3. Controles.....	56
3.5.4. Realização dos ensaios.....	56
3.5.5. Ensaio de viabilidade da levedura <i>S. cerevisiae</i>	59
3.5.6. Análise dos resultados.....	60
4. RESULTADOS.....	62
4.1. Ensaio de mutagenicidade com extratos de <i>M. hirtum</i>	62
4.2. Ensaio de mutagenicidade com extratos de <i>C. pallida</i>	62
4.3. Ensaio de mutagenicidade com frações obtidas do extrato de semente de <i>C. pallida</i>	63
4.4. Ensaio de mutagenicidade com frações obtidas do extrato de folhas de <i>C. pallida</i>	64
4.5. Ensaio de mutagenicidade com estigmasterol, isolado da fração diclorometânica das folhas de <i>C. pallida</i>	65
4.6. Ensaio para quantificação de PGE-2.....	73
4.6.1. Atividade citotóxica.....	73
4.6.2. Ensaio para quantificação de NO.....	73
4.6.2.1. Quantificação de NO com extrato de semente de <i>C. pallida</i>	73
4.6.2.2. Quantificação de NO com fração alcaloídica de semente de <i>C. pallida</i>	74
4.6.3. Ensaio para quantificação de PGE-2.....	75
4.6.3.1. Quantificação de PGE-2 com extrato de semente de <i>C. pallida</i>	75
4.6.3.2. Quantificação de PGE-2 com fração alcaloídica de semente de <i>C. pallida</i>	76
4.7. Ensaio de estroginicidade (RYA).....	78
4.7.1. Viabilidade das leveduras <i>S. cerevisiae</i>	78
4.7.2. Equivalentes em estradiol (EEQ) e valores de EC50 dos extratos de <i>M. hirtum</i> e <i>C. pallida</i>	78

4.7.3. Equivalentes em estradiol (EEQ) e valores de EC50 das frações enriquecidas de <i>C. pallida</i>	80
4.7.4. Equivalentes em estradiol (EEQ) e valores de EC50 do estigmasterol isolado da fração diclorometânica de folhas de <i>C. pallida</i>	81
4.7.5. Análise da atividade estrogênica por meio da avaliação da β -galactosidase, expressa em unidades de fluorescência dos extratos de <i>M. hirtum</i> e <i>C. pallida</i>	82
4.7.6. Análise da atividade estrogênica por meio da avaliação da β -galactosidase, expressa em unidades de fluorescência das frações enriquecidas de <i>C. pallida</i>	90
4.7.7. Análise da atividade estrogênica por meio da avaliação da β -galactosidase, expressa em unidades de fluorescência do estigmasterol isolado da fração diclorometânica das folhas de <i>C. pallida</i>	105
5. DISCUSSÃO.....	107
5.1. Atividade mutagênica.....	107
5.2. Envolvimento de COX-2 em processos cancerígenos.....	112
5.3. Atividade estrogênica.....	115
6. CONCLUSÕES.....	124
6.1. Teste de Ames.....	124
6.2. Ativação COX-2.....	124
6.3. Teste de RYA.....	125
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	126
Anexo I	145

Resumo

A família Fabaceae tem ocorrência em toda faixa tropical e em regiões temperadas, sendo uma família que apresenta grande potencial econômico. *Machaerium*, um dos gêneros pertencente a esta família, tem sido utilizado para diversos fins, tais como a recomposição de áreas degradadas ou uso medicinal para o tratamento de diarreia, cólicas menstruais, tosse e aftas bucais. Já o gênero *Crotalaria*, tem sido empregado na agricultura como adubo verde no combate à erosão e também despertado interesse para a indústria farmacêutica, já que os componentes produzidos por plantas deste gênero podem atuar como antimicrobiano, antimalárico, anti-inflamatório, anti-hepatotóxico e até mesmo no tratamento contra o câncer. As plantas medicinais têm sido cada vez mais empregadas na recuperação da saúde, sendo nas últimas décadas, muitos estudos direcionados na identificação de produtos naturais com propriedades terapêuticas. Apesar da notável utilização das plantas no tratamento das mais diversas patologias, a pesquisa científica tem mostrado que alguns componentes presentes nestas plantas podem apresentar efeitos nocivos, como a mutagenicidade, o que pode restringir seu uso. Assim, é indispensável a realização de ensaios que possam garantir o uso seguro desses compostos. Diante disso, o teste de Ames foi empregado no presente trabalho para análise do potencial mutagênico de *Machaerium hirtum* e *Crotalaria pallida*, já que consiste num ensaio de triagem para avaliação da atividade mutagênica, identificando mutágenos entre substâncias puras, em misturas e em amostras ambientais. Tanto o extrato de folhas, quanto o de caule de *M. hirtum* não se mostraram mutagênicos em nenhuma das concentrações testadas, o que é interessante, visto a grande utilização popular e propriedades farmacológicas já descritas para esta planta. Para os extratos provenientes de folhas e semente de *C. pallida*, foram obtidos resultados positivos no teste de Ames, o que torna insegura a utilização dos mesmos. Sabendo que além da atividade mutagênica, a ativação da enzima ciclooxigenase-2 (COX-2) também está envolvida na carcinogênese, buscou-se verificar se as amostras altamente mutagênicas eram capazes de desempenhar atividade inflamatória, o que contribuiria para o processo de carcinogênese. Foi verificado que tanto o extrato quanto a fração alcaloídica de semente de *C. pallida*, apesar de se mostrarem altamente mutagênicos, não foram capazes de estimular COX-2. O teste de estrogenicidade

utilizando o ensaio de RYA também foi realizado com as amostras, tendo como propósito encontrar candidatos para substituir o estrogênio na terapia de reposição hormonal durante a menopausa. Todos os extratos de *C. pallida* apresentaram resultados interessantes quanto ao potencial estrogênico. O estigmasterol, isolado da fração diclorometânica de *C. pallida* foi altamente estrogênico, fornecendo os mais altos valores de equivalente em estradiol. Sendo um dos objetivos do estudo a busca por substituintes promissores para a terapia de reposição estrogênica, o estigmasterol apareceu como um candidato em potencial, já que demonstrou excelentes resultados quanto à estrogenicidade pelo teste de RYA e ausência de atividade mutagênica quando avaliado pelo ensaio de Ames.

Palavras-chave: mutagenicidade, estrogenicidade, *Machaerium hirtum*, *Crotalaria pallida*.

Abstract

The Fabaceae family has occurred throughout the tropical and temperate regions, been a family that has great economic potential. *Machaerium*, one of the genera belonging to this Family, has been used for various purposes since the restoration of degraded areas, to treat diarrhea, menstrual cramps, coughing, and thrush. The genus *Crotalaria* has been used in agriculture as fertilizer to prevent erosion and also aroused interest in the pharmaceutical industry, since the components produced by these plants can act as antimicrobial, antimalarial, anti-inflammatory, anti-hepatotoxic and even in cancer treatment. Medicinal plants have been increasingly employed in health recovery, and in recent decades, many studies have focused on the identification of natural products with therapeutic properties. Despite the remarkable use of plants in the treatment of several pathologies, scientific research has shown that some components present in these plants may have adverse effects as mutagenicity, which may restrict their use. Thus, assays that ensure the use of these compounds are extremely important. Therefore, Ames test was employed in this study to analyze the mutagenic potential of *Crotalaria pallida* and *Machaerium hirtum* because this assay is a screening test for evaluation of mutagenic activity, identifying mutagens between pure substances and mixtures and in environmental samples. Both leave and stem extracts from *M. hirtum* were not mutagenic in any of the tested concentrations, which is interesting because the wide use and pharmacological properties from this plant. In the extracts of leaves and seeds from *C. pallida*, positive results were obtained in the Ames test, which make unsafe their use. Knowing that beyond the mutagenic activity, activation of the enzyme cyclooxygenase-2 (COX-2) is also involved in carcinogenesis, it was evaluated if the extract and the alkaloidal fraction from *C. pallida* seed, which were highly mutagenic, were able to play inflammatory activity (COX-2 activation), contributing to the process of carcinogenesis. However, none of the two samples was able to stimulate significantly the enzyme. The estrogenicity test was also performed, using RYA assay in order to find candidates for estrogen replacement in hormone replacement therapy during menopause. All extracts from *C. pallida* showed interesting results regarding the potential estrogenic. The stigmaterol, isolated of dichlorometanic fraction from *C. pallida* leaves, was highly estrogenic providing the highest values of equivalent to estradiol. As one of the purposes of the study was to search

for promising substituents for estrogen replacement therapy, stigmasterol appeared as a potential candidate, because it has demonstrated excellent results for testing estrogenicity by RYA and absence of mutagenic activity when assessed by testing Ames.

Keywords: mutagenicity; estrogenicity, *Machaerium hirtum*, *Crotalaria pallida*.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Abs – absorvância

AchE- acetilcolinesterase

AMG - ágar mínimo glicosado

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AP- alcaloide pirrolizidinico

ATCC- American Type Culture Collection

BY4741 – linhagem de *Saccharomyces cerevisiae*

CCD- Cromatografia de Camada Delgada

CHCl₃ – clorofórmico

DMEM - *Dulbecco's modification of Eagle's medium*

DMSO - dimetilsufóxido

DNA - ácido desoxirribonucléico

D.O. - densidade óptica

DP – desvio padrão

EC₅₀ - concentração efetiva mediana

EEQ- Equivalente em estradiol

ELL- Extração líquido- líquido

EtOH- etanólico

Fr Aq- Fração aquosa

Fr DCM- Fração diclorometânica

His – histidina

RM – razão de mutagenicidade

Leu – leucina

MeOH – metanólico

Met – metionina

MPLC- Cromatografia líquida de média pressão

MTT - brometo de 3-metil-[4-5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazólio

MuGal - 4-metilumbeliferil β - D –galactosídeo

nm- nanômetro

NO- óxido nítrico

OMS - Organização Mundial de Saúde

PG- prostaglandina

PGE2- prostaglandina

PBS - *Phosphate Buffered Saline*

pH5HE0; pVitBX2; pAAH5; pSFLΔ-178K – plasmídeos

RE - receptor de estrógeno

RE α - receptores α -estrogênico

RE β - receptores β -estrogênico

RM – razão de mutagenicidade

RMN- Ressonância magnética nuclear

rpm – rotação por minuto

RYA – Ensaio com leveduras recombinantes (*Recombinant Yeast Assay*)

SDS - dodecil sulfato de sódio

S9 – fração microsomal de fígado de ratos tratados com Aroclor 1254

TA97a, TA98, TA100, TA102 – cepas de *Salmonella typhimurium*

UFC - unidades formadoras de colônias

Ura – uracila

UV – ultravioleta

YPD – *Yeast Nitrogen Base*

Y-PER – tampão de lise

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Detalhes de *Machaerium hirtum*: a) caule, b) ramos com inflorescências, c) folhas e fruto (MARTINS, 2009) – página 28

Figura 2: Folhas trifoliadas de *C. pallida* (SCHMALSTING, 1997) - página 30

Figura 3: Estrutura das substâncias identificadas em folhas de *M. hirtum*: a) apigenina-6-C- β -D-glucopiranosil-7-O- β -D-glucopiranosídeo, b) apigenina-6-C- β -D-glucopiranosídeo, c) luteolina-6-C- β -D-glucopiranosídeo - página 41

Figura 4: Estrutura das substâncias isoladas de caule de *M. hirtum*. a) R=R2=CH3, R1=H: alfa- amirina; R=R1=CH3, R2=H: beta amirina, b) alantoína – página 42

Figura 5: Estrutura dos alcaloides pirrolizidínicos encontrados em *C. pallida* – página 44

Figura 6: Estrutura proposta para F1– página 45

Figura 7: Estrutura química do estigmasterol – página 46

Figura 8: Produção de NO em cultura de macrófagos RAW.264, na presença de cinco concentrações do extrato de semente de *C. pallida*. (Controle negativo: Meio DMEM; Controle positivo: lipopolissacarídeo de *E. coli*- LPS) – página 74

Figura 9: Produção de NO em cultura de macrófagos RAW.264, na presença de cinco concentrações da fração alcaloídica de semente de *C. pallida*. (Controle negativo: Meio DMEM; Controle positivo: lipopolissacarídeo de *E. coli*- LPS) – página 75

Figura 10: Produção de PGE2 em cultura de macrófagos RAW.264, na presença de cinco concentrações do extrato de semente de *C. pallida*. (Controle negativo: Meio DMEM; Controle positivo: lipopolissacarídeo de *E. coli*- LPS) – página 76

Figura 11: Produção de PGE2 em cultura de macrófagos RAW.264, na presença de cinco concentrações da fração alcaloídica de semente de *C. pallida*. (Controle negativo: Meio DMEM; Controle positivo: lipopolissacarídeo de *E. coli*- LPS) – página 77

Figura 12: Atividade estrogênica, expressa em unidades de fluorescência, das diferentes concentrações testadas do extrato de folhas de *M. hirtum*, utilizando a linhagem geneticamente modificada BY4741 de *S. cerevisiae*, sendo as médias das unidades de fluorescência do extrato comparadas com as do controle negativo (DMSO a 10%).

Fluorescência do C+ (17- β -estradiol): 13263 ± 537 – página 84

Figura 13: Cinética do extrato de folhas de *M. hirtum*, mostrando as unidades de fluorescência em função do tempo das cinco concentrações testadas dos controles negativo (DMSO a 10%) e positivo (10 nM de estradiol) – página 84

Figura 14: Atividade estrogênica, expressa em unidades de fluorescência, das diferentes concentrações testadas do extrato de caule de *M. hirtum*, utilizando a linhagem geneticamente modificada BY4741 de *S. cerevisiae*, sendo as médias das unidades de fluorescência do extrato comparadas com as do controle negativo (DMSO a 10%).

Fluorescência do C+ (17- β -estradiol): 15140 ± 342 – página 85

Figura 15: Cinética do extrato de caule de *M. hirtum*, mostrando as unidades de fluorescência em função do tempo das cinco concentrações e dos controles negativo (DMSO a 10%) e positivo (10 nM de estradiol) – página 85

Figura 16: Atividade estrogênica, expressa em unidades de fluorescência, das diferentes concentrações testadas do extrato de flores de *C. pallida*, utilizando a linhagem geneticamente modificada BY4741 de *S. cerevisiae*, sendo as médias das unidades de fluorescência do extrato comparadas com as do controle negativo (DMSO a 10%).

Fluorescência do C+ (17- β -estradiol): 11569 ± 985 – página 86

Figura 17: Cinética do extrato de flores de *C. pallida*, mostrando as unidades de fluorescências em função do tempo das cinco concentrações e dos controles negativo (DMSO a 10%) e positivo (10 nM de estradiol) – página 86

Figura 18: Atividade estrogênica, expressa em unidades de fluorescência, das diferentes concentrações testadas do extrato de folhas de *C. pallida*, utilizando a linhagem geneticamente modificada BY4741 de *S. cerevisiae*, sendo as médias das unidades de fluorescência do extrato comparadas com as do controle negativo (DMSO a 10%).

Fluorescência do C+ (17- β -estradiol): 9834 ± 985 – página 87

Figura 19: Cinética do extrato de folhas de *C. pallida*, mostrando as unidades de fluorescência em função do tempo das cinco concentrações e dos controles negativo (DMSO a 10%) e positivo (10 nM de estradiol) – página 87

Figura 20: Atividade estrogênica, expressa em unidades de fluorescência, das diferentes concentrações testadas do extrato de semente de *C. pallida*, utilizando a linhagem geneticamente modificada BY4741 de *S. cerevisiae*, sendo as médias das unidades de fluorescência do extrato comparadas com as do controle negativo (DMSO a 10%).

Fluorescência do C+ (17- β -estradiol): 11569 ± 1280 – página 88

Figura 21: Cinética do extrato de semente de *C. pallida*, mostrando as unidades de fluorescência em função do tempo das cinco concentrações e dos controles negativo (DMSO a 10%) e positivo (10 nM de estradiol) – página 88

Figura 22: Atividade estrogênica, expressa em unidades de fluorescência, das diferentes concentrações testadas do extrato de pericarpo de *C. pallida*, utilizando a linhagem geneticamente modificada BY4741 de *S. cerevisiae*, sendo as médias das unidades de fluorescência do extrato comparadas com as do controle negativo (DMSO a 10%).

Fluorescência do C+ (17- β -estradiol): 9246 ± 965 – página 89

Figura 23: Cinética do extrato de pericarpo de *C. pallida*, mostrando as unidades de fluorescência em função do tempo das cinco concentrações e dos controles negativo (DMSO a 10%) e positivo (10 nM de estradiol) – página 89

Figura 24: Atividade estrogênica, expressa em unidades de fluorescência, das diferentes concentrações testadas da fração diclorometânica de flores de *C. pallida*, utilizando a linhagem geneticamente modificada BY4741 de *S. cerevisiae*, sendo as médias das unidades de fluorescência do extrato comparadas com as do controle negativo (DMSO a 10%).

Fluorescência do C+ (17- β -estradiol): 8410 ± 375 – página 92

Figura 25: Cinética fração diclorometânica de flores de *C. pallida*, mostrando as unidades de fluorescência em função do tempo das cinco concentrações e dos controles negativo (DMSO a 10%) e positivo (10 nM de estradiol) – página 92

Figura 26: Atividade estrogênica, expressa em unidades de fluorescência, das diferentes concentrações testadas da fração clorofórmica de flores de *C. pallida*, utilizando a linhagem geneticamente modificada BY4741 de *S. cerevisiae*, sendo as médias das unidades de fluorescência do extrato comparadas com as do controle negativo (DMSO a 10%).

Fluorescência do C+ (17- β -estradiol): 6162 ± 578 – página 93

Figura 27: Cinética fração clorofórmica de flores de *C. pallida*, mostrando as unidades de fluorescência em função do tempo das cinco concentrações e dos controles negativo (DMSO a 10%) e positivo (10 nM de estradiol) – página 93

Figura 28: Atividade estrogênica, expressa em unidades de fluorescência, das diferentes concentrações testadas da fração butanólica de flores de *C. pallida*, utilizando a linhagem geneticamente modificada BY4741 de *S. cerevisiae*, sendo as médias das unidades de fluorescência do extrato comparadas com as do controle negativo (DMSO a 10%).

Fluorescência do C+ (17- β -estradiol): 6985 ± 665 – página 94

Figura 29: Cinética fração butanólica de flores de *C. pallida*, mostrando as unidades de fluorescência em função do tempo das cinco concentrações e dos controles negativo (DMSO a 10%) e positivo (10 nM de estradiol) – página 94

Figura 30: Atividade estrogênica, expressa em unidades de fluorescência, das diferentes concentrações testadas da fração diclorometânica de folhas de *C. pallida*, utilizando a linhagem geneticamente modificada BY4741 de *S. cerevisiae*, sendo as médias das unidades de fluorescência do extrato comparadas com as do controle negativo (DMSO a 10%).

Fluorescência do C+ (17- β -estradiol): 11490 ± 496 – página 95

Figura 31: Cinética fração diclorometânica de folhas de *C. pallida*, mostrando as unidades de fluorescência em função do tempo das cinco concentrações e dos controles negativo (DMSO a 10%) e positivo (10 nM de estradiol) – página 95

Figura 32: Atividade estrogênica, expressa em unidades de fluorescência, das diferentes concentrações testadas da fração clorofórmica de folhas de *C. pallida*, utilizando a linhagem geneticamente modificada BY4741 de *S. cerevisiae*, sendo as médias das unidades de fluorescência do extrato comparadas com as do controle negativo (DMSO a 10%).

Fluorescência do C+ (17- β -estradiol): 11966 ± 492 – página 96

Figura 33: Cinética fração clorofórmica de folhas de *C. pallida*, mostrando as unidades de fluorescência em função do tempo das cinco concentrações e dos controles negativo (DMSO a 10%) e positivo (10 nM de estradiol) – página 96

Figura 34: Atividade estrogênica, expressa em unidades de fluorescência, das diferentes concentrações testadas da fração butanólica de folhas de *C. pallida*, utilizando a linhagem geneticamente modificada BY4741 de *S. cerevisiae*, sendo as médias das unidades de fluorescência do extrato comparadas com as do controle negativo (DMSO a 10%).

Fluorescência do C+ (17- β -estradiol): 12512 ± 302 – página 97

Figura 35: Cinética fração butanólica de folhas de *C. pallida*, mostrando as unidades de fluorescência em função do tempo das cinco concentrações e dos controles negativo (DMSO a 10%) e positivo (10 nM de estradiol) – página 97

Figura 36: Atividade estrogênica, expressa em unidades de fluorescência, das diferentes concentrações testadas da fração diclorometânica de semente de *C. pallida*, utilizando a linhagem geneticamente modificada BY4741 de *S. cerevisiae*, sendo as médias das unidades de fluorescência do extrato comparadas com as do controle negativo (DMSO a 10%).

Fluorescência do C+ (17- β -estradiol): 9099 ± 54 – página 98

Figura 37: Cinética fração diclorometânica de semente de *C. pallida*, mostrando as unidades de fluorescência em função do tempo das cinco concentrações e dos controles negativo (DMSO a 10%) e positivo (10 nM de estradiol) – página 98

Figura 38: Atividade estrogênica, expressa em unidades de fluorescência, das diferentes concentrações testadas da fração clorofórmica de semente de *C. pallida*, utilizando a linhagem geneticamente modificada BY4741 de *S. cerevisiae*, sendo as médias das unidades de fluorescência do extrato comparadas com as do controle negativo (DMSO a 10%).

Fluorescência do C+ (17- β -estradiol): 8159 ± 386 – página 99

Figura 39: Cinética fração clorofórmica de semente de *C. pallida*, mostrando as unidades de fluorescência em função do tempo das cinco concentrações e dos controles negativo (DMSO a 10%) e positivo (10 nM de estradiol) – página 99

Figura 40: Atividade estrogênica, expressa em unidades de fluorescência, das diferentes concentrações testadas da fração butanólica de semente de *C. pallida*, utilizando a linhagem geneticamente modificada BY4741 de *S. cerevisiae*, sendo as médias das unidades de fluorescência do extrato comparadas com as do controle negativo (DMSO a 10%).

Fluorescência do C+ (17- β -estradiol): 9099 ± 54 – página 100

Figura 41: Cinética fração butanólica de semente de *C. pallida*, mostrando as unidades de fluorescência em função do tempo das cinco concentrações e dos controles negativo (DMSO a 10%) e positivo (10 nM de estradiol) – página 100

Figura 42: Atividade estrogênica, expressa em unidades de fluorescência, das diferentes concentrações testadas da fração alcaloídica de semente de *C. pallida*, utilizando a linhagem geneticamente modificada BY4741 de *S. cerevisiae*, sendo as médias das unidades de fluorescência do extrato comparadas com as do controle negativo (DMSO a 10%).

Fluorescência do C+ (17- β -estradiol): 9126 ± 249 – página 101

Figura 43: Cinética fração alcaloídica de semente de *C. pallida*, mostrando as unidades de fluorescência em função do tempo das cinco concentrações e dos controles negativo (DMSO a 10%) e positivo (10 nM de estradiol) – página 101

Figura 44: Atividade estrogênica, expressa em unidades de fluorescência, das diferentes concentrações testadas da fração diclorometânica de pericarpo de *C. pallida*, utilizando a linhagem geneticamente modificada BY4741 de *S. cerevisiae*, sendo as médias das unidades de fluorescência do extrato comparadas com as do controle negativo (DMSO a 10%).

Fluorescência do C+ (17- β -estradiol): 13057 ± 254 – página 102

Figura 45: Cinética fração diclorometânica de pericarpo de *C. pallida*, mostrando as unidades de fluorescência em função do tempo das cinco concentrações e dos controles negativo (DMSO a 10%) e positivo (10 nM de estradiol) – página 102

Figura 46: Atividade estrogênica, expressa em unidades de fluorescência, das diferentes concentrações testadas da fração clorofórmica de pericarpo de *C. pallida*, utilizando a linhagem geneticamente modificada BY4741 de *S. cerevisiae*, sendo as médias das unidades de fluorescência do extrato comparadas com as do controle negativo (DMSO a 10%).

Fluorescência do C+ (17- β -estradiol): 13057 ± 254 – página 103

Figura 47: Cinética fração clorofórmica de pericarpo de *C. pallida*, mostrando as unidades de fluorescência em função do tempo das cinco concentrações e dos controles negativo (DMSO a 10%) e positivo (10 nM de estradiol) – página 103

Figura 48: Atividade estrogênica, expressa em unidades de fluorescência, das diferentes concentrações testadas da fração butanólica de pericarpo de *C. pallida*, utilizando a linhagem geneticamente modificada BY4741 de *S. cerevisiae*, sendo as médias das unidades de fluorescência do extrato comparadas com as do controle negativo (DMSO a 10%).

Fluorescência do C+ (17- β -estradiol): 13724 ± 669 – página 104

Figura 49: Cinética fração butanólica de pericarpo de *C. pallida*, mostrando as unidades de fluorescência em função do tempo das cinco concentrações e dos controles negativo (DMSO a 10%) e positivo (10 nM de estradiol) – página 104

Figura 50: Atividade estrogênica, expressa em unidades de fluorescência, das diferentes concentrações testadas de estigmasterol proveniente de folhas de *C. pallida*, utilizando a linhagem geneticamente modificada BY4741 de *S. cerevisiae*, sendo as médias das unidades de fluorescência do extrato comparadas com as do controle negativo (DMSO a 10%).

Fluorescência do C+ (17- β -estradiol): 9678 ± 167 – página 106

Figura 51: Cinética do estigmasterol proveniente de folhas e caula de *C. pallida*, mostrando as unidades de fluorescência em função do tempo das cinco concentrações e dos controles negativo (DMSO a 10%) e positivo (10 nM de estradiol) – página 106

Figura 52: Estrutura básica dos flavonóides – página 109

Figura 53: Luteolina – página 109

Figura 54: Apigenina – página 109

Figura 55: Estrutura do estradiol com o grupo farmacofórico: Duas hidroxilas separadas por uma estrutura lipofílica de 1 nanômetro – página 116

Figura 56: Similaridade estrutural entre o estigmasterol e o 17- β -estradiol – página 122

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Avaliação da atividade mutagênica expressa pelo número de revertentes/ placa \pm DP e razão de mutagenicidade (RM) do extrato metanólico de caule de *M. hirtum* em linhagens de *S. typhimurium* na ausência de metabolização (-S9) e presença de metabolização (+S9) – página 66

Tabela 2: Avaliação da atividade mutagênica expressa pelo número de revertentes/placa \pm DP e razão de mutagenicidade (RM) do extrato etanólico de folhas de *M. hirtum* em linhagens de *S. typhimurium* na ausência de metabolização (-S9) e presença de metabolização (+S9) – página 66

Tabela 3: Avaliação da atividade mutagênica expressa pelo número de revertentes/placa \pm DP e razão de mutagenicidade (RM) do extrato etanólico de flores de *C. pallida* em linhagens de *S. typhimurium* na ausência de metabolização (-S9) e presença de metabolização (+S9) – página 67

Tabela 4: Avaliação da atividade mutagênica expressa pelo número médio de revertentes/placa \pm DP e razão de mutagenicidade (RM) do extrato etanólico das folhas de *C. pallida* em linhagens de *S. typhimurium*, na ausência (-S9) e na presença de metabolização (+S9) – página 67

Tabela 5: Avaliação da atividade mutagênica expressa pelo número médio de revertentes/placa \pm DP e razão de mutagenicidade (RM) do extrato etanólico de semente de *C. pallida* em linhagens de *S. typhimurium*, na ausência (-S9) e na presença de metabolização (+S9) – página 68

Tabela 6: Avaliação da atividade mutagênica expressa pelo número médio de revertentes/placa \pm DP e razão de mutagenicidade (RM) do extrato etanólico de pericarpo de *C. pallida* nas linhagens de *S. typhimurium*, na ausência (-S9) e na presença de metabolização (+S9) – página 68

Tabela 7: Avaliação da atividade mutagênica expressa pelo número médio de revertentes/placa \pm DP e razão de mutagenicidade (RM) da fração alcaloídica do extrato de semente de *C. pallida* na linhagem TA98, na ausência (-S9) e presença (+S9) de metabolização – página 69

Tabela 8: Avaliação da atividade mutagênica expressa pelo número médio de revertentes/placa \pm DP e razão de mutagenicidade (RM) das frações diclorometânica, clorofórmica e butanólica provenientes do extrato de semente de *C. pallida* na linhagem TA98 na ausência (-S9) e na presença de metabolização (+S9) – página 69

Tabela 9: Avaliação da atividade mutagênica expressa pelo número médio de revertentes/placa \pm DP e razão de mutagenicidade (RM) das frações diclorometânica, clorofórmica e butanólica provenientes do extrato de folhas de *C. pallida* na linhagem TA98 na ausência de atividade metabólica (-S9) – página 72

Tabela 10: Avaliação da atividade mutagênica expressa pelo número médio de revertentes/placa \pm DP e razão de mutagenicidade (RM) do estigmasterol, substância isolada, proveniente da fração diclorometânica de folhas de *C. pallida* na linhagem TA98 na ausência (-S9) e presença de metabolização (+S9) – página 72

Tabela 11: Atividade estrogênica expressa através dos valores de equivalentes de estradiol (EEQ) \pm desvio padrão dos extratos e valores de EC 50 de *M. hirtum* (folhas e caule) e *C. pallida* (flores, folhas, semente e pericarpo), utilizando a linhagem geneticamente modificada BY4741 de *S. cerevisiae* – página 79

Tabela 12: Atividade estrogênica expressa através dos valores de equivalentes de estradiol (EEQ) \pm desvio padrão e valores de EC50 das frações enriquecidas provenientes de flores, folhas, semente e pericarpo de *C. pallida* utilizando a linhagem geneticamente modificada BY4741 de *S. cerevisiae* – página 81

1. INTRODUÇÃO

1.1. Interesse crescente no estudo de plantas

O consumo de plantas medicinais foi a primeira forma de uso de remédios que se tem notícia (BRAGANÇA, 1996) sendo sua utilização no tratamento de enfermidades tão antigo quanto a espécie humana (MACIEL *et al.*, 2002). A busca e a utilização de plantas com propriedades medicinais é uma prática milenar, atestada em vários tratados de fitoterapia das grandes civilizações, como os chineses e egípcios que desde 3000 a.C., já cultivavam plantas medicinais (SILVA JUNIOR, 2003).

Desde o princípio das civilizações, os vegetais têm sido empregados não apenas como fonte alimentícia, mas também medicamentosa. Diversas enfermidades têm sido tratadas com o uso de chás (infusos, decoctos, macerados), sucos, tinturas, banhos, cataplasma e unguentos, preparados a partir de plantas (ALMEIDA, 1993).

Os primeiros relatos de utilização de plantas medicinais foram obtidos da Mesopotâmia e datam de 2.600 a.C., e algumas das espécies utilizadas são ainda mencionadas atualmente para o tratamento de tosse, febre e inflamação (GURIB-FAKIM, 2006).

O desenvolvimento da química orgânica ocorreu paralelamente ao estudo de plantas, principalmente a partir do século XIX, quando foram registrados os primeiros estudos, com base científica. Isso resultou no isolamento de alguns princípios ativos de plantas, já então conhecidas como medicinais. Desses estudos foram obtidas algumas substâncias que se consagraram como princípios ativos eficazes, sendo ainda empregados no tratamento de certas doenças, a exemplo de morfina, quinina e cânfora (MONTANARI, 2001).

O consumo de plantas medicinais e o seu emprego na recuperação da saúde têm evoluído desde as formas mais simples de tratamento local até as formas tecnologicamente sofisticadas da fabricação industrial (LORENZI e MATOS, 2002). Nas últimas décadas, muitos estudos têm sido dirigidos à identificação de produtos naturais com propriedades terapêuticas (BAE *et al.*, 2002; DA SILVA *et al.*, 2005; WEISBURGER *et al.*, 1996), podendo ser utilizados diretamente ou servir de modelos para a síntese de novos princípios bioativos (DOMINGO e LÓPEZ-BREA, 2003). Estima-se que aproximadamente 40% dos medicamentos atualmente disponíveis foram desenvolvidos direta ou indiretamente a partir de

fontes naturais, assim subdivididos: 25% de plantas, 12% de microorganismos e 3% de animais (CALIXTO, 2001).

Grande parte da população dos países em desenvolvimento usa preparações vegetais como primeiros cuidados à saúde, devido uma perspectiva cultural e também ao alto custo agregado aos medicamentos alopáticos (ADDAE-MENSAH, 1992).

Apesar da grande evolução da medicina alopática a partir da segunda metade do século XX, existem obstáculos básicos na sua utilização pelas populações carentes, que vão desde o acesso aos centros de atendimento hospitalares até a obtenção de exames e medicamentos. Estes motivos, associados à grande tradição do uso de plantas medicinais, contribuem para sua utilização pelas populações dos países em desenvolvimento (VEIGA JUNIOR *et al.*, 2005).

A definição de planta medicinal, dada pela Organização Mundial da Saúde (OMS), consiste em “todo e qualquer vegetal que possui, em um ou mais órgãos, substâncias que podem ser utilizadas com fins terapêuticos ou que sejam precursores de fármacos semi-sintéticos” (VEIGA JUNIOR *et al.*, 2005).

O fitoterápico é todo medicamento obtido empregando-se exclusivamente matérias-primas ativas vegetais. É caracterizado pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade. Sua eficácia e segurança são validadas através de levantamentos etnofarmacológicos e documentações tecnocientíficas em publicações ou ensaios clínicos fase 3. Não se considera medicamento fitoterápico aquele que, na sua composição, inclua substâncias ativas isoladas, de qualquer origem, nem as associações destas com extratos vegetais (RDC nº 48/04 – Anvisa; BRASIL, 2000).

A fitoterapia esteve, por longo período, sob o domínio popular onde o conhecimento empírico do valor medicinal das plantas prestou importantes serviços (MENDONÇA, 1989; MARTINS *et al.*, 2000). Esta forma de terapia medicinal vem crescendo notadamente, de maneira que o mercado mundial de fitoterápicos gira em torno de bilhões de dólares (YUNES *et al.*, 2001).

A busca de fontes alternativas aos medicamentos industrializados e a validação do uso de plantas medicinais se torna justificável devido ao crescimento na demanda de medicamentos e o elevado custo decorrente das patentes tecnológicas envolvidas. Assim, o fitoterápico aparece como uma opção interessante já que possuem um custo mais acessível

quando comparado àqueles obtidos por síntese química (FARNSWORTH e MORRIS, 1976; TOLEDO *et al.*, 2003).

Embora a medicina moderna esteja bem desenvolvida na maior parte do mundo, a OMS reconhece que grande parte da população dos países em desenvolvimento depende da medicina tradicional para sua atenção primária, tendo em vista que 80% desta população utilizam práticas tradicionais nos seus cuidados básicos de saúde e 85% destes utilizam plantas ou preparações destas (BRASIL, 2006).

Diante da grande utilização de produtos vegetais por parte da população, a OMS tem fortalecido a necessidade de valorizar a utilização de plantas medicinais no âmbito sanitário (GRIPPI, 2001). Neste sentido, tem sido elaborada uma série de resoluções com objetivo de considerar o valor potencial da medicina tradicional em seu conjunto para a expansão dos serviços de saúde regionais. O Ministério da Saúde também desenvolve diversas ações junto a outros órgãos governamentais e não-governamentais para elaboração de políticas públicas voltadas à inserção de plantas medicinais e da fitoterapia no Sistema Único de Saúde (SUS) e ao desenvolvimento do setor (BRASIL, 2006).

No Brasil, uma das políticas públicas elaboradas dentro deste contexto é a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, aprovada por meio do Decreto Nº 5.813, de 22 de junho de 2006, tendo como objetivos a garantia do acesso seguro e uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos em nosso país, além do desenvolvimento de tecnologias e inovações, o fortalecimento das cadeias produtivas e o uso sustentável da biodiversidade brasileira (BRASIL, 2006).

1.2. Família Fabaceae

A família Leguminosae Adans., também conhecida como Fabaceae, compreende aproximadamente 36 tribos, 727 gêneros e 19.327 espécies, ocorrendo em toda faixa tropical e em regiões temperadas (LEWIS *et al.*, 2005), sendo a terceira maior família das Angiospermas (MABBERLEY, 1997). Está dividida em três subfamílias, Caesalpinioideae, Mimosoideae e Papilionoideae (LEWIS *et al.*, 2005).

No Brasil ocorrem aproximadamente 200 gêneros e 1.500 espécies distribuídas na maioria dos ecossistemas, sendo neste país, uma das principais famílias das Angiospermas (SOUZA e LORENZI 2008), além de ser considerada uma família de grande importância econômica e ecológica (POLHILL, 1981; LEWIS *et al.*, 2005; SOUZA e LORENZI, 2008).

As principais espécies da família são as utilizadas na alimentação, como por exemplo, o feijão (*Phaseolus vulgaris*), a soja (*Glycine max*), o amendoim (*Arachis hypogaea*), a ervilha (*Pisum sativum*), o tremoço (*Lupinus spp.*), o grão-de-bico (*Cicer arietinum*) e o tamarindo (*Tamarindus indica*). Outra importante aplicação dessa família é o seu uso na adubação verde. Dentre as espécies que são comercializadas com esta função estão o feijão-guandu (*Cajanus cajan*), o lab-lab (*Lablab purpureus*), a crotalária (*Crotalaria spp.*) e a alfafa (*Medicago sativa*), esta última também frequentemente utilizada como forrageira (SOUZA e LORENZI, 2005).

As sementes de Fabaceae são fonte de nutrientes como o amido, proteínas, fibras alimentares e minerais, particularmente em países do terceiro mundo. A utilização dessas sementes na dieta humana nos países em desenvolvimento pode oferecer efeitos protetores contra doenças crônicas, já que integrantes dessa família contêm substâncias como flavonoides, ácidos fenólicos, lignanas e taninos que podem desempenhar propriedades antioxidantes e são de grande importância do ponto de vista nutricional e tecnológico. Esses antioxidantes podem atuar na prevenção do estresse oxidativo, o qual está intimamente ligado à uma variedade de doenças como o câncer e doenças cardiovasculares (AMAROWICZ e PEGG, 2008).

1.3. Gênero *Machaerium*

O gênero *Machaerium*, pertencente à família Fabaceae, foi descrito por Persoon (1807) e está subordinado à subfamília Papilionoideae e à tribo Dalbergieae Bronn ex DC., que consiste de 19 gêneros e aproximadamente 300 espécies (POLHILL, 1981). Encontra-se entre os maiores gêneros arbóreos tropicais de leguminosas, possuindo cerca de 130 espécies, distribuídas do México à Argentina, com um representante ocorrendo na costa oeste africana (RUDD, 1977).

O Brasil possui o maior número de espécies, que variam de árvores a plantas escandentes, inermes ou espinescentes, sendo que as formas escandentes predominam na hiléia amazônica, enquanto as arbóreas, no sul do Brasil (DUCKE, 1949). *Machaerium* da região equatorial pode se apresentar como lianas, arbustos ou árvores. Algumas espécies, como as encontradas na Floresta Amazônica, aparecem na forma de árvores com altura entre 25 a 30 metros (LOZANO e KLITGAAARD, 2006).

As folhas geralmente são alternadas, membranosas ou coriáceas, podendo ser observada uma variação no número de folhas entre as espécies. Em relação à casca, as espécies podem apresentar fissuras. Já as inflorescências aparecem como uma pseudo-panícula terminal ou auxiliar, sendo as brácteas encontradas ao redor da base (LOZANO e KLITGAAARD, 2006).

As flores podem variar de 8 mm como no *M. multifoliolaruim* à 20 mm em *M. kegelli*, diclamídeas, com pétalas róseas, amarelas, brancas ou creme-esverdeadas. Os frutos podem ser divididos em 2 tipos: os dispersos pelo vento, caracterizados por uma semente basal e uma asa terminal e os que possuem uma semente que compreende quase todo o fruto, sugerindo uma dispersão por mamíferos (LOZANO e KLITGAAARD, 2006; MARTINS, 2009; BASTOS, 1987)

O nome *Machaerium* provavelmente é originado da palavra “machete”, que em grego significa facão, referindo-se à forma dos frutos (PÉREZ-ARBELÁEZ, 1994). Suas espécies são popularmente conhecidas como jacarandá (LEWIS *et al.*, 2005) e utilizadas para diversos fins, como na recomposição de áreas degradadas (LORENZI 1992, 1998; POTT e POTT, 1994). Populações indígenas da América do Sul têm utilizado plantas desse gênero para tratar

diarréia (POTT e POTT, 2004), cólicas menstruais (GINZBARG,1977), tosse e aftas bucais (JOLY, 1987).

Investigações químicas de várias espécies presentes no Brasil, Peru e Venezuela têm revelado a presença de triterpenos (MAGALHÃES *et al.*, 1966) e flavonoides (OLLIS *et al.*, 1978a, 1978b; KUROSAWA *et al.*, 1978; ANIMASHAUN *et al.*, 1993), incluindo isoflavonoides, neoflavonoides, isoflavonas e lectinas em espécies como *M. vestitum*, *M. villosum* e *M. biovulatum*. Alguns desses isoflavonoides e lectinas apresentaram atividades anti-HIV e anti-inflamatórias (ANIMASHAUN *et al.*, 1993, EMIM *et al.*, 1994). Já a espécie *M. aristulatum* apresentou isoflavonoides com atividade anti-giardia (ELSOHLY *et al.*, 1999).

A espécie *Machaerium hirtum* (Vell.) Stellfeld, utilizada neste estudo, é conhecida popularmente por “jacarandá-bico-de-pato”, com ocorrência em formações florestais do interior do Brasil. Possui folíolos estreito-oblongos, pelos acúleos, retilíneos e achatados e hábitos sempre arbóreos (SOUZA e LORENZI, 2008). Na literatura são descritos alguns usos populares dessa planta, sendo as cascas utilizadas para tratamento de diarréia, tosse e câncer (POTT e POTT, 2004).

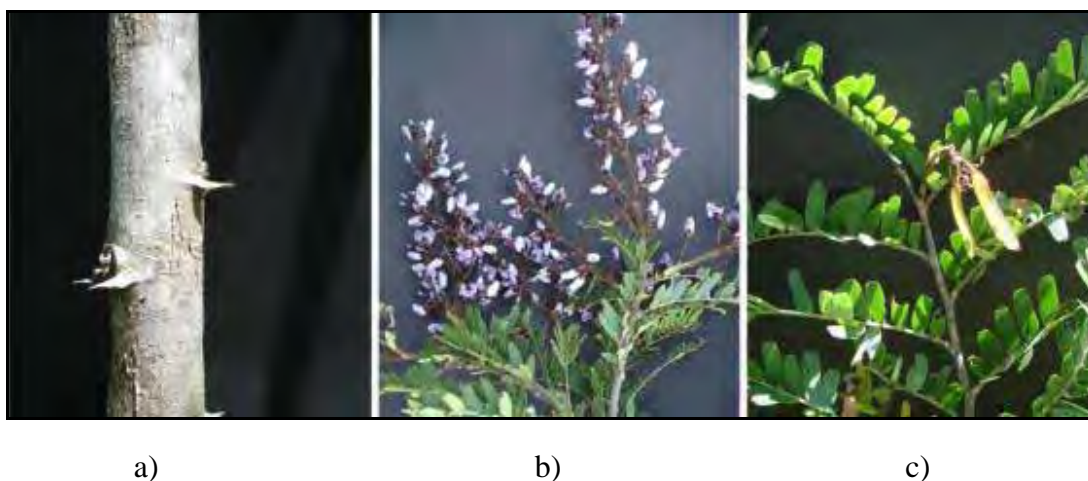


Figura 1. Detalhes de *Machaerium hirtum*: a) caule, b) ramos com inflorescências, c) folhas e fruto (MARTINS, 2009)

1.4. Gênero *Crotalaria*

O gênero *Crotalaria*, pertencente à família Fabaceae, é amplamente distribuído em regiões tropicais. Há aproximadamente 400 espécies encontradas na África, 15 na Austrália (ALLEN e ALLEN, 1981) e no Brasil há pelo menos, 40 espécies de *Crotalaria*, sendo as mais comuns *C. mucronata* Desv. (= *C. striata* DC, *C. pallida*, *C. saltiana*, *C. vitellina* Kerr, *C. anagyroides* H.B.K. e *C. retusa* L) (TOKARNIA *et al.*, 2000).

As plantas desse gênero são conhecidas por “xique-xique”, “guizo-de-cascavel” ou “chocalho-de-cascavel”, devido ao som produzido pelos frutos, quando secos, ao serem tocados. Em função disso, a planta recebeu o nome científico de *Crotalaria*, termo que em latim significa chocalho (EVERIST, 1974).

As plantas possuem caules eretos, raramente espinescentes, folhas comomentes trifoliadas, com pecíolos sésseis. As flores geralmente apresentam coloração amarela, ocasionalmente com manchas avermelhadas ou roxas (ALLEN e ALLEN, 1981).

As espécies do gênero possuem considerável plasticidade, adaptando-se a diferentes condições ambientais. Podem ocorrer em variados tipos de habitats, sendo muito comuns em margem de estradas e como invasoras de culturas (FLORES, 2005).

Na agricultura de países tropicais, as espécies desse gênero são de grande importância, sendo utilizadas como adubo verde para cobertura de solo e combate à erosão, fertilizante devido à capacidade de fixação do nitrogênio atmosférico e como agente biológico no controle das áreas infectadas com nematoides. São utilizadas também na produção de fibras e celulose de alta qualidade (MEDINA, 1959; POHHIL, 1982).

A indústria farmacêutica tem um interesse crescente em substâncias do metabolismo secundário de espécies de *Crotalaria*, que são particularmente ricas em alcalóides pirrolizidínicos (APs) (FLORES, 2004). Esses alcalóides podem atuar como antimicrobianos e em alguns insetos estimulam a ovoposição (CAMPO *et al.* 2005). A crotaorixina é outra substância de interesse, pois inibe o crescimento do parasita causador da malária, *Plasmodium falciparum* (NARANDER *et al.*, 2005). Já os ácidos crotálicos e emarginélico apresentam atividade anti-inflamatória e anti-hepatotóxica, respectivamente (AHMED *et al.*,

2006). Há relato de outras substâncias que auxiliam na função imune e na prevenção e tratamento do câncer (SEONG *et al.*, 2007).

A espécie *Crotalaria pallida* Aiton. (Leguminosae, Papilionoideae, Crotalarieae), utilizada no estudo, é uma planta daninha pantropical, leguminosa subarborescente nativa dos trópicos do Velho Mundo, de porte alto (0,5 -1,5 m), ereta, bem ramificada. As folhas são alternas, digitadas trifolioladas e pecioladas, os folículos são obovados, com o ápice mucronado (Figura 2). O fruto mede de 2,5 a 4,0 cm, quando imaturo é denso e pubescente, maduro é glabro e de coloração castanha (SCHMALSTING, 1997; POLHILL, 1982). Análises fitoquímicas evidenciaram a presença de alcalóides pirroizídínicos em *C. pallida*, como senecionina, integerrimina, retrosina, usaramina (FERRO, 2001).

Alguns usos populares são descritos para esta planta, como a utilização da raiz para o tratamento de inchaços dolorosos das articulações e, do suco proveniente das folhas como vermífugo (JAIN e BORTHAKUR, 1980).

Em relação aos estudos farmacológicos, Ko *et al.* (2003) mostraram que as cascas de *C. pallida* demonstraram potencial anti-inflamatório. Além disso, peptídeos presentes em sementes dessa planta apresentaram atividade contra bactérias gram-negativas (*Proteus* sp e *Escherichia coli*) e contra fungos fitopatogênicos despertando interesse para a área medicinal e para o agronegócio (PELEGRINI *et al.*, 2009).

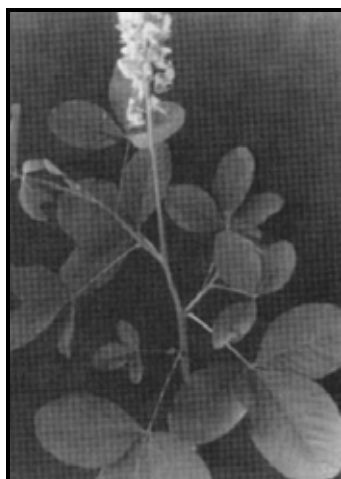


Figura 2: Folhas trifoliadas de *C. pallida* (SCHMALSTING, 1997)

1.5. Atividade mutagênica

Embora plantas medicinais venham sendo utilizadas no tratamento de doenças, a pesquisa científica tem mostrado que algumas substâncias presentes nessas plantas podem apresentar propriedades indesejáveis, como mutagenicidade, o que pode restringir seu uso como agentes terapêuticos (NUNES *et al.*, 2012; MARQUES *et al.*, 2003; DE SÁ FERREIRA *et al.*, 1999).

O confrei (*Symphytum officinale* L.), considerado um produto natural com propriedade cicatrizante devido à presença de alantoína, foi condenado pela OMS por provocar doença hepática veno-oclusiva, desencadeada pelos alcaloides pirrolizidínicos, que além de causarem hepatotoxicidade, possuem propriedades mutagênicas e carcinogênicas (BUCKEL e TOWARD, 1998).

Mutagenicidade é definida como uma alteração permanente no conteúdo ou estrutura do material genético de um organismo, podendo ser manifestada como uma alteração herdável em decorrência de mutação em células germinativas e/ou mutações somáticas levando ao desenvolvimento de câncer ou outros processos crônicos degenerativos (DEARFIELD, 2002).

As mutações podem ocorrer em nível gênico, como alterações de um único nucleotídeo (mutação gênica ou pontual) ou em nível cromossômico, como aberrações que atingem cromossomos inteiros ou pedaços de cromossomos (MATEUCA *et al.*, 2006). Em nível gênico, as mutações podem ser subdivididas em substituição de pares de bases e alteração na matriz de leitura, ocorrendo por adição ou deleção de nucleotídeos. Já as mutações cromossômicas podem ser divididas em numéricas, que por sua vez são subdivididas em euploidias (envolvem genomas inteiros) e aneuploidias (envolvem parte do genoma), e mutações cromossômicas estruturais, sendo elas: deleção, duplicação, translocação e inversão (GRIFFITHS *et al.*, 2006).

As mutações despertam grande interesse por estarem diretamente relacionadas ao desenvolvimento de diversas doenças degenerativas tais como câncer e arteriosclerose (DE FLORA, 1998; SEO *et al.*, 2000). Geralmente, o câncer começa após um episódio mutacional em uma única célula e gradualmente se transforma em uma doença maligna de múltiplos estágios, através da aquisição sequencial de mutações adicionais (LOH *et al.*, 2009). Diante

disso, é fundamental a realização de testes e estudos que garantam a utilização segura desses compostos.

Testes de mutagenicidade avaliam um evento inicial ou intermediário da tumorigênese (FEARON e VOGELSTEIN, 1990). As mutações genéticas podem ser avaliadas utilizando bactérias ou outros sistemas, já que podem ocasionar mudanças nas necessidades para o crescimento da célula, como por exemplo, no teste de Ames, o qual é amplamente utilizado para identificar substâncias capazes de produzir danos genéticos e darem origem a mutações gênicas (MORTELMANS e ZIEGER, 2000).

1.5.1. Teste de Ames para determinação da atividade mutagênica

O teste de Ames é um dos ensaios de triagem mais utilizado para detectar o potencial mutagênico de compostos (CARIELLO e PIEGORSCH, 1996; UMBUZEIRO e VARGAS *et al.*, 2003). Esse teste, também conhecido como teste de mutação gênica reversa com *Salmonella*, tem sido utilizado para identificar mutágenos entre substâncias puras, em misturas e em amostras ambientais (MARON e AMES, 1983).

O ensaio emprega linhagens de *Salmonella typhimurium* derivadas da parental LT2, auxotróficas para histidina (His-), apresentando diferentes mutações no “operon” deste aminoácido, sendo desenvolvidas para detectar mutações do tipo deslocamento do quadro de leitura (*frameshift*) ou substituições de bases no DNA (MARON e AMES, 1983; MORTELMANS e ZEIGER, 2000).

As mutações presentes no “operon” da histidina tornam as linhagens incapazes de crescer na ausência deste aminoácido (histidina-dependentes). Na presença de um composto mutagênico, novas mutações no local dessas mutações pré-existentes, ou nas proximidades dos genes, podem restaurar a função do gene e permitir que as células sintetizem histidina. Estas células recém-mutadas podem crescer na ausência do aminoácido e formar colônias. Deste modo, o teste é muitas vezes referido como um “ensaio de reversão”. O número de revertentes é facilmente medido pela contagem de uma população de bactérias da amostra a ser testada (MORTELMANS e ZEIGER, 2000).

Muitas substâncias podem danificar diretamente o material genético, (mutágenos diretos). Já alguns agentes carcinogênicos, como aminas aromáticas ou hidrocarbonetos

policíclicos, são biologicamente inativos, a menos que sejam biotransformados para suas formas ativas (mutágenos indiretos). Em humanos e alguns animais esta metabolização é realizada através do complexo enzimático P450, presente principalmente no fígado. As enzimas deste sistema são capazes de metabolizar grande número de compostos a potentes intermediários mutagênicos. Como as bactérias não possuem esta capacidade metabólica, um sistema enzimático exógeno (fração S9) é adicionado ao ensaio, permitindo a identificação de mutágenos indiretos (AMES *et al.*, 1973; GARNER *et al.*, 1972). Todas essas características conferem ao teste de Ames uma sensibilidade e eficiência na identificação e caracterização de diferentes agentes mutagênicos (SANTOS *et al.*, 2006).

1.6. Envolvimento da COX-2 em processos cancerígenos

Os processos inflamatórios são muitas vezes precursores da carcinogênese. O gene COX-2 é um dos envolvidos nesse processo, que catalisa a síntese de prostaglandinas, as quais estão associadas às vias de promoção tumoral (ANTONUCCI, 2005).

COX-1 e COX-2 são enzimas que regulam etapas da síntese de prostanóides (tromboxanos e prostaglandinas). Neste processo, a enzima fosfolipase A catalisa a hidrólise de fosfolipídios da membrana, liberando o ácido araquidônico (AA), enquanto a COX converte o AA em precursores prostanoides (MURAKAMI *et al.*, 1999).

As prostaglandinas (PGs) regulam diversos processos patofisiológicos como a reação inflamatória, citoproteção gastrointestinal e ulceração, hemostasia e trombose, bem como a hemodinâmica renal (SMITH *et al.*, 2001). Mais recentemente, uma terceira isoforma foi identificada, COX-3, como uma variante da COX-1. COX-3 parece desenvolver um papel na febre e processos de dor (CHANDRASEKHARAN *et al.*, 2002).

COX-1 é uma enzima expressa constitutivamente em muitos tecidos e está envolvida na síntese de prostaglandinas as quais controlam processos fisiológicos normais. Por outro lado, COX-2 não é detectada na maioria dos tecidos normais (exceto no sistema nervoso, renal e nas vesículas seminais) e sim, induzida por vários estímulos inflamatórios e mitogênicos. Fatores de crescimento como fator de crescimento epidermal (EGF), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) citocinas pró- inflamatórias (interleucina (IL) 1 β , IL2), fator de necrose tumoral (TNF), promotores de tumor, ácidos biliares e radiação

ultravioleta B estimulam a expressão de COX-2. (CHEN *et al.*, 2001; DEMPKE *et al.*, 2001; PEPPELENBOSCH *et al.*, 1993; ZHANG *et al.*, 1998).

O papel da COX-2 na carcinogênese já tem sido descrito, sendo a forma induzida desta enzima detectada em tumores humanos e utilizada em modelos experimentais de câncer (CHAN *et al.*, 1999). A superexpressão de COX-2 promove crescimento celular, inibe apoptose, e aumenta a motilidade celular e adesão de células epiteliais intestinais (TSUJII *et al.*, 1997).

COX-2 aparece com expressão elevada em diversos tumores, incluindo tumores de cólon, cabeça e pescoço, mama e pulmão (DANNENBERG, 2001). A superexpressão desta enzima também é frequentemente detectada em tumores gástricos (MURATA *et al.*, 1999).

Dados *in vivo*, *in vitro*, clínicos e observacionais têm confirmado que inibidores seletivos da COX-2 reduzem a produção de prostaglandinas e o risco de câncer de cólon, pele e outras neoplasias, demonstrando que a COX-2 está relacionada ao desenvolvimento da carcinogênese, promoção de tumor, inibição da apoptose, estímulo da angiogênese e do processo de metástase (DANNENBERG *et al.*, 2005).

A base celular e molecular da inflamação tem se tornado um tópico de grande interesse devido à associação entre os mecanismos de inflamação e o risco de câncer. Os eventos mediados por processos inflamatórios, tais como a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS - *reactive oxygen species*), a ativação de fatores de crescimento (para reparo de feridas), e a alteração de vias de sinalização ativam a proliferação celular para substituir células e tecidos necróticos ou apoptóticos (ARDIES, 2003).

Sabendo que COX-2 não é apenas um marcador de inflamação, mas está ativamente envolvida no processo de carcinogênese (TSUJII *et al.*, 1998), o presente trabalho procurou verificar se a atividade mutagênica desempenhada por algumas amostras (atividade determinada pelo teste de Ames) aparece associada a um processo inflamatório contribuindo ainda mais para a carcinogênese. Para tanto, a verificação da ativação de COX-2 foi realizada indiretamente, a partir da quantificação de prostaglandina (PGE2) e também pela quantificação de óxido nítrico (NO).

1.7. Atividade estrogênica

Muitos pesquisadores têm dirigido suas investigações para várias vias bioquímicas mediadas pela ativação ou inibição de enzimas envolvidas com o processo de comunicação celular ou transdução do sinal celular. Existe um grande número de mensageiros intracelulares que participam destas rotas, dentre eles podemos citar os hormônios (YUNES e CALIXTO, 2001).

Geralmente, o hormônio reage especificamente com algum receptor e produz o efeito biológico. Dessa forma, as terapias de reposição hormonal, como a utilizada durante a menopausa, envolvem hormônios naturais ou compostos químicos com estruturas similares (VALERIE, 2000). A menopausa é definida pela OMS como a interrupção permanente da menstruação, como resultado da perda da função folicular ovariana ou de remoção cirúrgica dos ovários, cessando a produção de estrógenos (BURGER *et al.*, 2002)

Estrógeno é um termo usado para um grupo de hormônios naturais esteroides com 18 carbonos, secretados principalmente pelo ovário, e em menor quantidade, pelas adrenais. O estrogênio engloba três hormônios esteroides estruturalmente semelhantes: 17- β -estradiol, estrona e estriol, sendo o 17- β -estradiol o principal esteroide em humanos (KENDALL e ESRON, 2002). Eles desempenham papel importante no crescimento, diferenciação e função de muitos alvos, incluindo os sistemas reprodutores feminino e masculino além de apresentarem uma variedade de funções farmacológicas, como manutenção da massa óssea, prevenindo a osteoporose, proteção cardiovascular e cerebral (RYMER *et al.*, 2003).

A diminuição dos níveis de estrógeno em mulheres na pós-menopausa associa-se ao desenvolvimento de doenças crônicas e problemas cardiovasculares (MAYES e WATSON, 2004). Como exemplos de problemas decorrentes da menopausa aparecem a redução da densidade óssea (osteoporose) e maior incidência de tumores, além dos sintomas clássicos que incluem calores súbitos, ansiedade e variações de humor (HARLOW e SIGNORELLO, 2000).

Um estudo apresentado por Hong *et al.* (2007) mostrou a associação entre adipocitocinas séricas (adiponectina, resistina, leptina, TNF α) e os níveis séricos de estrogênio (estrona e estradiol), sendo observado que os níveis de TNF α após a menopausa

foram significativamente maiores, sugerindo que a deficiência de estrogênio está relacionada ao aumento de citocinas inflamatórias séricas, contribuindo para o desenvolvimento de aterosclerose e diabetes mellitus tipo 2.

Apesar dos inúmeros benefícios oferecidos pelo estrogênio, é sabido que a longo prazo, a terapia de reposição de estrogênios (TRE) pode resultar em efeitos indesejáveis como a elevação do risco de câncer de mama (SANTEN *et al.*, 2010; STURDEE e PINES, 2011). Desse modo, é crescente o número de pesquisas de compostos que possam oferecer os benefícios da TRE sem os efeitos indesejáveis do estrogênio (YUNES e CALIXTO, 2001).

Dentro deste contexto, os produtos derivados de plantas, como por exemplo os fitoestrógenos e fitoesteroides, aparecem como uma opção terapêutica, já que podem atuar na prevenção de desconfortos relacionados ao desequilíbrio hormonal (NAEYER *et al.*, 2004. VIEIRA, 2007). É sabido que a ingestão de fitoestrógenos, como as isoflavonas da soja (genisteína e daidzeína) tem sido associada à redução dos sintomas da menopausa, além de estar relacionada à diminuição de câncer, particularmente cânceres estrogênio-dependentes, como câncer de mama, doenças cardiovasculares e osteoporose (LINSEISEN *et al.*, 2004; KLEIN, KING *et al.*, 2007).

Dados epidemiológicos sugerem que os cânceres de mama e próstata são menos incidentes nos países asiáticos, devido à maior ingestão de fitoestrógenos na dieta (MAGEE e ROWLAND, 2004; THAM, 1998). O papel dos fitoestrógenos em modificar o risco de câncer pode não estar associado somente às suas propriedades estrogênicas, mas também por exercer papel mediador em outros eventos bioquímicos relacionados (THAM *et al.*, 1998).

Os fitoestrógenos são metabólitos especiais, polifenólicos não-esteroidais de plantas (WARD e KUHNLE, 2010), que podem atuar como agonistas de receptor de estrogênio, imitando os estrogênios endógenos e causando efeitos estrogênicos ou como antagonistas do receptor, que podem bloquear ou alterar os receptores de estrogênio modificando a resposta estrogênica (PINTO *et al.*, 2008). Já foi demonstrado que, na ausência de estrogênio, essas moléculas possuem efeito estrogênico fraco, ao passo que, na presença de estrogênio, podem exercer ações antagônicas, sugerindo mecanismo competitivo pelo receptor (OLIVEIRA *et al.*, 2006). Além disso, os fitoestrógenos podem afetar a síntese, o transporte, o metabolismo e a excreção dos hormônios, alterando as concentrações dos hormônios naturais (SANTAMARTA, 2001; GHISELLI e JARDIM, 2007; FERNANDEZ *et al.*, 2009).

As principais classes de fitoestrógenos são as isoflavonas (encontradas principalmente em legumes, grão de bico e soja), flavonoides prenilados (presentes no lúpulo), cumestanos (encontrados em legumes jovens como brotos de alfafa ou trevo) e lignanas (encontradas em cereais, linhaça e outras frutas e legumes (OSBORNE, 1998; OSBORNE *et al.*, 2000).

Grande parte dos efeitos dos estrógenos é mediada através da sua ligação a proteínas nucleares, os chamados receptores de estrogênio (REs), fatores de transcrição que regulam a expressão de genes responsivos estrógenos. Compostos naturais e drogas sintéticas com similaridade estrutural ao estrógeno natural, também são capazes de se ligarem aos REs, mimetizando os efeitos do estrógeno ou então, desempenhando atividade antiestrogênica (OSBORNE, 1998; OSBORNE *et al.*, 2000).

1.7.1. Ensaio de estrogenicidade *in vitro* – RYA

Os bioensaios *in vitro*, principalmente aqueles baseados nos mecanismos de ação dos estrógenos, estão se tornando cada vez mais importantes na identificação e avaliação da atividade estrogênica. Eles são meios rápidos, eficazes e eficientes de avaliação da estrogenicidade de um grande número de amostras ambientais e compostos, minimizando o uso de animais de laboratório (ZACHAREWSKI, 1997; CÉSPEDES *et al.*, 2004).

Um dos testes utilizado para avaliar o potencial estrogênico de amostras é o teste RYA (Recombinant Yeast Assay), o qual foi utilizado no presente trabalho para análise do potencial estrogênico das plantas *M. hirtum* e *C. pallida*. Esse teste utiliza células da levedura *Saccharomyces cerevisiae* geneticamente modificadas que expressam constitutivamente o receptor de estrógeno humano e respondem à ligação de substâncias estruturalmente semelhantes ao estrógeno verificando a afinidade de ligação de compostos ao receptor de estrógeno (GARCIA-REYERO *et al.*, 2005).

No RYA, as cepas de leveduras geneticamente modificadas (*S. cerevisiae*) expressam dois elementos genéticos: um gene sensor, o receptor de estrógeno humano (RE) e um gene repórter, contendo o elemento responsivo a estrógeno do gene da vitelogenina B1 de *Xenopus laevis*, o qual promove a expressão da enzima β -galactosidase pela ativação do gene lacZ (GARCIA-REYERO *et al.*, 2005). O gene repórter é construído de uma forma que esta enzima só será expressa na presença do complexo receptor-ligante, imitando o mecanismo

pelo qual muitos genes responsivos a hormônios são regulados nos vertebrados (CÉSPEDES *et al.*, 2005; NOGUEROL *et al.*, 2006). A expressão do gene repórter é então monitorada pela atividade enzimática utilizando substratos, cujos produtos são facilmente detectados e quantificados (NOGUEROL *et al.*, 2006).

Neste teste é utilizado como substrato 4-metilumbeliferona β -D galactopiranosídeo (MuGal). A hidrólise desse substrato promove a formação de um produto fluorescente, 4-metilumbeliferona, o qual é medido em espectrofotômetro (355 nm de excitação e 460 nm de emissão). Uma curva dose-resposta relacionando a atividade da enzima β -galactosidase com a concentração de estradiol é usada para atribuir um valor estradiol-equivalente (EEQ) (NOGUEROL *et al.*, 2006; FERNANDEZ *et al.*, 2009).

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVOS GERAIS

Avaliar a mutagenicidade e estrogenicidade de plantas da família Fabaceae (*M. hirtum* e *C. pallida*), que estão inseridas no Projeto BIOTA-FAPESP, além de analisar se as amostras mutagênicas são capazes de estimular a enzima COX-2, contribuindo com o processo de carcinogênese.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a mutagenicidade, pelo teste de Ames, dos extratos etanólico de folhas e metanólico de caule de *M. hirtum* e dos extratos etanólicos de flores, folhas, sementes e de pericarpo de *C. pallida*, utilizando as linhagens TA98, TA97a, TA100 e TA102, na presença e ausência de metabolização;
- Avaliar a mutagenicidade, por meio do teste de Ames, das frações enriquecidas (diclorometânica, clorofórmica, butanólica e alcaloídica) provenientes dos extratos de folhas e de semente de *C. pallida*, utilizando a linhagem TA98;
- Analisar o estigmasterol, isolado das folhas de *C. pallida*, quanto à mutagenicidade *in vitro*, utilizando o teste de Ames;
- Avaliar a estrogenicidade, por meio do teste RYA, dos extratos de folhas e de caule de *M. hirtum*, bem como dos extratos de flores, folhas, semente e de pericarpo de *C. pallida*;
- Avaliar a atividade estrogênica das frações enriquecidas (diclorometânica, clorofórmica e butanólica) provenientes dos extratos de flores, folhas, semente e de pericarpo de *C. pallida*;
- Analisar o potencial estrogênico desempenhado pelo estigmasterol, utilizando o ensaio de RYA;
- Selecionar as amostras com maior potencial mutagênico e analisá-las quanto ao potencial inflamatório, através da ativação de COX-2.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Obtenção do material vegetal.

Os extratos de folhas e caule de *M. hirtum* e os extratos de flores, folhas e caule, semente e de pericarpo de *C. pallida*, bem como as frações enriquecidas de flores, semente, folhas e também de pericarpo de *C. pallida* (diclorometânica, clorofórmica, butanólica e alcalóidica, sendo esta última apenas de semente) e a substância isolada das folhas de *C. pallida* (estigmasterol) foram obtidos no Instituto de Química da UNESP, campus Araraquara-SP, sob a coordenação do Prof. Dr. Wagner Vilegas e Profa. Dra. Lourdes Campaner dos Santos.

3.2. Coleta e Preparo do Material Vegetal

3.2.1. Coleta de folhas e caule de *M. hirtum* (Vell.) Stelfeld

As folhas e caule de *M. hirtum* foram coletados nas proximidades de Cachoeira Indiana, no município de Botucatu, no início de 2009, pelo Professor Luis Fernando Rolim de Almeida, sendo que as exsiccatas encontram-se depositadas no Herbário da UNESP de Botucatu (BOTU 027643).

3.2.2. Preparação do extrato de folhas de *M. hirtum*

Folhas de *M. hirtum* foram secas em estufa a 40°C e moídas em moinho de facas com um tamanho médio de partícula de 1 a 3 mm. Em seguida, foram submetidas à percolação (PRISTA, 1995). O processo teve início com o intumescimento prévio de aproximadamente 1,0 kg do pó com 4,0 L de etanol 70% (v/v) durante 2 horas fora do percolador. Após esse período, o percolador foi empacotado com a mistura (pó + etanol 70%). O empacotamento foi feito de forma mais homogênea possível, respeitando a proporção 5:1 em relação ao tamanho do percolador. A vazão do percolador foi ajustada para 1,0 a 2,0 mL/min/Kg de material vegetal. Após a extração, os extratos foram rotaevaporados sob pressão reduzida em

temperatura de 40°C, liofilizados e armazenados em frascos âmbar vedados. Após esse processo foi determinado o rendimento do extrato das folhas (170,0 g = 17%).

O perfil químico do extrato foi estabelecido por HPLC-PDA e a quantificação das substâncias foi feita com base em suas agliconas, pelo método da calibração externa. Foi possível identificar as flavonas saponarina (apigenina-6-C-β-D-glucopiranosil-7-O-β-D-glucopiranosídeo - $8,69 \pm 0,46$ mg/g de extrato), isovitexina (apigenina-6-C-β-D-glucopiranosídeo - $6,44 \pm 0,45$ mg/g de extrato), isoorientina (luteolina-6-C-β-D-glucopiranosídeo), que se apresentou abaixo do limite de quantificação (TANGERINA, 2012).

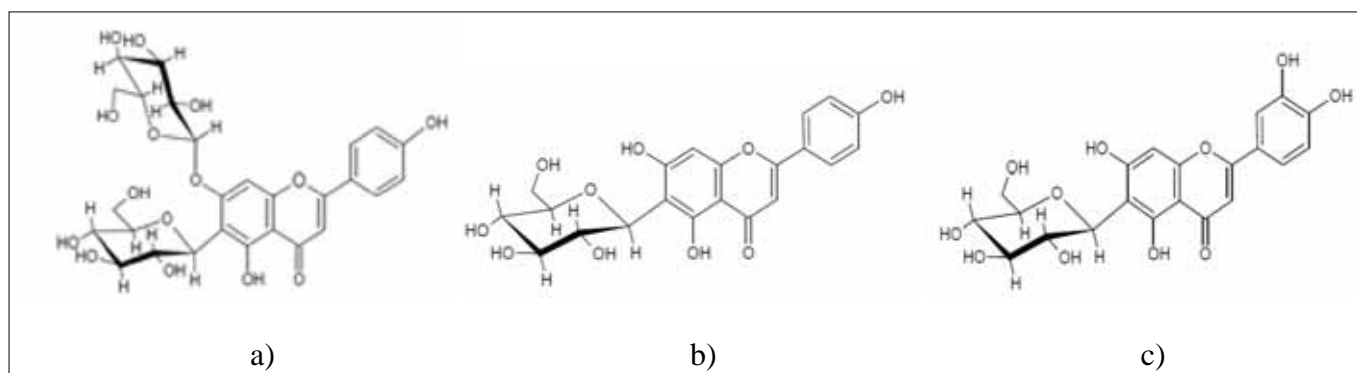


Figura 3: Estrutura das substâncias identificadas em folhas de *M. hirtum*: a) apigenina-6-C-β-D-glucopiranosil-7-O-β-D-glucopiranosídeo, b) apigenina-6-C-β-D-glucopiranosídeo, c) luteolina-6-C-β-D-glucopiranosídeo (TANGERINA, 2012)

3.2.3. Preparação do extrato de caule de *M. hirtum*

Caule de *M. hirtum* foram secos em estufa a 40°C e moídos em moinho de facas com um tamanho médio de partícula de 1 a 3 mm. Em seguida, 500 g de caule foram submetidos à percolação em metanol, obtendo-se o extrato metanólico com 79,1 g (16%). O perfil cromatográfico por HPLC-DAD indicou a presença de flavonas. Após fracionamento em coluna de sephadex-LH 20 (eluição com metanol) da fração butanólica do extrato resultou na identificação de triterpenos (alfa e beta amirina) e alantoína (Figura 4).

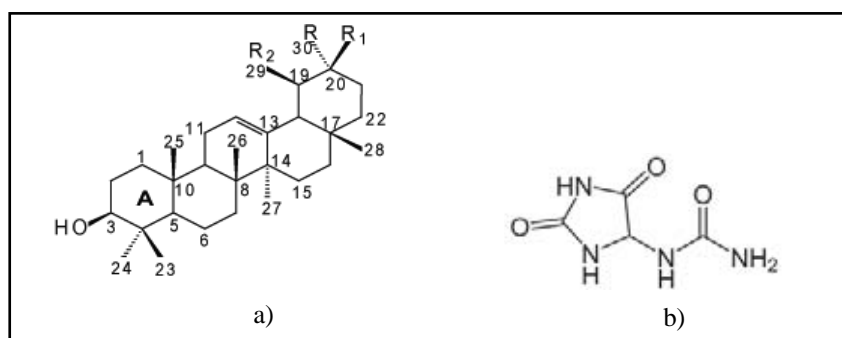


Figura 4: Estrutura das substâncias isoladas de caule de *M. hirtum*. a) R=R2=CH3, R1=H: alfa- amirina; R=R1=CH3, R2=H: beta amirina, b) alantoína (TANGERINA, 2012).

3.2.4. Coleta de flores, folhas, semente e pericarpo de *C. pallida*

As folhas (890,0 g), flores (92,0 g), pericarpo (209,0 g) e sementes (124,0 g) de *C. pallida* Aiton – (Fabaceae) foram coletadas em fevereiro de 2010 no município de Poços de Caldas (MG). A identificação foi realizada pelo Prof. Dr. Luis Victor Silva Sacramento, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP Araraquara, e depositada no herbário do Instituto de Botânica da UNESP Botucatu onde se encontra catalogada uma exsiccata (BOTU 28656).

3.2.5. Preparação dos extratos brutos de *C. pallida*

As partes coletadas da espécie vegetal foram previamente divididas, separadas e submetidas à secagem em estufa de ar circulante a 45°C até peso constante. As partes aéreas foram reduzidas ao estado de pó, por meio de moagem em moinho de faca. Em seguida, umedecidas com etanol 70% e deixadas em repouso por 2 horas, em recipientes fechados, ao abrigo da luz. Esse material foi então, acomodado em percolador, e submetido ao processo de lixiviação com etanol 70%, até o esgotamento total da droga. Após cada extração, o extrato foi filtrado em papel-filtro pregueado, concentrado em rotaevaporador sob pressão reduzida (temperatura de 40°C), até remoção completa do etanol. Em seguida, procedeu-se à liofilização, obtendo os extratos hidroalcoólicos 70%: 46,0 g de extrato de folhas (5 %), 19,3 g de extrato de flores (21 %), 18,0 g de extratos de pericarpo (9 %) e 19,9 g de extratos de

sementes (16 %). Os extratos das folhas e pericarpo forneceram os menores rendimentos, se comparados aos demais extratos a mesma espécie.

3.2.6 Perfil cromatográfico dos extratos EtOH 70% de *C. pallida*

A fim de determinar com maior precisão os tipos de metabólitos secundários presentes no extrato etanólico 70% (EtOH 70%) das partes aéreas de *C. pallida* e assim estabelecer uma estratégia para a separação das substâncias presentes, foi registrado o perfil cromatográfico desses extratos por meio de análises por HPLC-DAD (HPLC-PDA, Jasco®, Coluna Phenomenex® Synergi Hydro RP-18 250 x 4,6mm i.d. ; 4µm, 1,0 mL min⁻¹, FM: A=H₂O com ácido fórmico 0,1 %., B=Acetonitrila, gradiente linear 0-100% de B 60 minutos).

A similaridade entre os perfis cromatográficos obtidos dos extratos EtOH 70 % das folhas, flores, pericarpo e sementes foi avaliada através da comparação dos sinais cromatográficos observados e seus espectros de absorção registrados com absorção (220 a 400 nm) e verificou-se a presença de flavonóides ($\lambda = 254\text{nm}$) e derivados de ácidos fenólicos ($\lambda = 254\text{nm}$) (GORDON *et al.*, 2001).

Análise dos espectros de absorção no ultravioleta dos picos revelou padrão similar de absorção máxima em 330-370 nm e 240-280 nm e após comparação com padrões disponíveis no Laboratório de Fitoquímica do Instituto de Química da UNESP de Araraquara, juntamente com dados da literatura (MABRY, 1970), foi possível inferir que os picos eram referentes a flavonoides, principalmente, dos derivados da apigenina e luteolina (flavonas).

3.2.7. Fracionamento e purificação do extrato das folhas de *C. pallida*

Optou-se por iniciar os estudos de fracionamento com o extrato das folhas em virtude da melhor resolução cromatográfica e da concentração de metabólitos do mesmo. Para o fracionamento do extrato EtOH 70% das folhas utilizou-se uma coluna Sephadex LH-20 como fase estacionária.

Após a análise das cromatografias de camada delgada (CCD) e reagrupamento das frações e tendo em vista que substâncias não foram isoladas, iniciou-se uma nova estratégia

na tentativa de isolar alguma substância do extrato EtOH 70% das folhas de *C. pallida* empregando a técnica de Cromatografia Líquida de Média Pressão (MPLC).

3.2.7.1. Caracterização e extração de alcaloides pirrolizidínicos

A literatura diz que espécies do gênero *Crotalaria* possuem alto teor de alcaloides pirrolizidínicos (APs) em determinadas partes do vegetal. O estudo da espécie *C. pallida*, realizados por FLETCHER *et al.* (2009) e FLORES *et al.* (2009) resultou na identificação de usaramine e integerrimine (Figura 5).

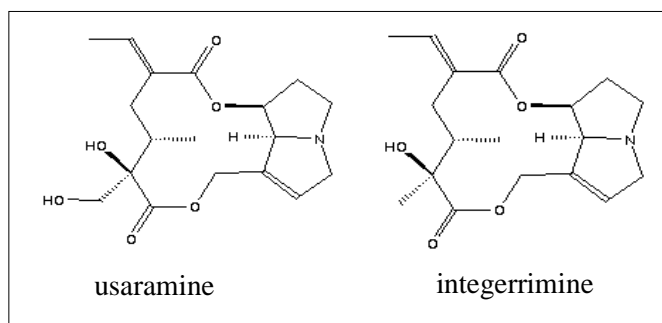


Figura 5: Estrutura de APs encontrados em *C. pallida*

Para a identificação de APs nas folhas de *C. pallida*, o extrato etanólico das folhas (2,0 g) foi solubilizado em solução de MeOH:H₂O (8:2 v/v). A fração não foi totalmente solúvel. O sobrenadante foi transferido para um funil de separação e submetido à acidificação com solução de ácido clorídrico (HCl) 2 N e, posteriormente, extraído três vezes com clorofórmio (CHCl₃). Objetivando-se obter uma fração rica em alcalóides pirrolizidínicos (APs) como base livre e não sob a forma de N-óxidos, optou-se pela redução da fração aquosa ácida, obtida anteriormente. Assim, a fase aquosa foi reduzida com excesso de Zinco por 3 horas em meio ácido, mantendo-se o pH entre 1-2. A fração aquosa reduzida foi alcalinizada com hidróxido de amônio (transformando os APs protonados em bases livres) e extraída com CHCl₃. A fração aquosa básica foi neutralizada com HCl e extraída com *N*-butanol.

O processo de extração, após neutralização e remoção dos solventes à pressão reduzida, gerou quatro frações denominadas clorofórmica (Cl I - 511,8 mg), clorofórmica básica (Cl I - 64,2 mg), butanólica (BuOH -1.028,9 mg) e a fração aquosa (Fr Aq -356,0 mg).

A fração clorofórmica básica (Cl II) foi submetida a dois métodos de identificação de alcaloides. O primeiro método utilizou o reagente de Dragendorff como revelador. O segundo método utilizou Metil Orange que, na presença de APs, apresenta a coloração rosa ou púrpura (BIRECKA, 1981), específico para APs. Esta metodologia de extração foi aplicada também a outras diferentes partes da planta para obtenção dos APs.

A fração Cl II apresentou coloração rosa púrpura confirmando a presença de alcaloides. Uma alíquota dessa fração foi filtrada em membrana de *nylon* (Millex[®] (0,45 µm) e injetada em HPLC (modo analítico). A análise da corrida cromatográfica em vários comprimentos de onda revelou uma substância na fração investigada. A Fração denominada F1 foi submetida às análises de RMN de ¹H e de ¹³C.

Os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN de ¹H e ¹³C) de F1 exibiram um conjunto de sinais compatíveis derivados de APs descritos na literatura. Trata-se de um alcaloide com estrutura de base necina com saturação em C1 e C2 como o isolado de *Crotalaria goriensis* descrito por Culvenor e Smith, (1961). Portanto interpretação destes dados e comparação com os existentes na literatura possibilitaram sugerir que esta substância é o 7hidroxi-1-metil-enepirrolizidino (Figura 6).

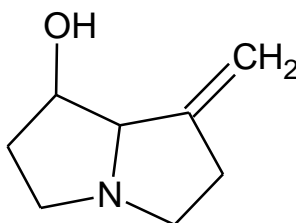


Figura 6: Estrutura proposta para a substância **F1**

3.2.7.2. Identificação do estigmasterol

Tendo em vista que demais substâncias não foram isoladas, realizou-se cromatografias por partições (Extração Líquido-Líquido – ELL) com diclorometano (DCM) e metanol : água (2:8 v/v) (3x) , obtendo-se duas frações com polaridades distintas: fração Diclorometano (Fr DCM) e Aquosa (Fr Aq). Cada uma das frações obtidas da ELL foi seca em rotaevaporador para a eliminação do solvente e depois liofilizadas.

As frações obtidas da ELL foram submetidas a um novo fracionamento empregando duas técnicas: a fração diclorometânica foi submetida à cromatografia de coluna aberta usando sílica gel como fase estacionária e para a fração aquosa foi empregada a técnica de Cromatografia Líquida de Média Pressão (MPLC) utilizando coluna empacotada com sílica de fase reversa C₁₈.

As frações obtidas no processo acima foram analisadas por HPLC-PDA a fim de se obter uma visão preliminar das substâncias presentes. Comparando-se os cromatogramas obtidos das frações da MPLC, notou-se que as substâncias que absorvem no UV, são majoritárias e pertencem à classe das flavonas. A cromatografia por MPLC não resultou em separação de substância pura fazendo-se necessário uma nova etapa de purificação utilizando HPLC- PDA preparativo no intuito de isolar as substâncias majoritárias.

A análise dos cromatogramas da fração diclorometânica permitiu inferir que havia pureza em uma das frações. Assim, a substância isolada foi denominada F2.

O espectro de RMN de ¹H apresentou sinais característicos de hidrogênios de esteroide (KAMBOJ, 2011). A comparação dos deslocamentos químicos de RMN de RMN ¹H da substância isolada (F2), com os registros na literatura (KAMBOJ, 2011) permitiu sua identificação como sendo o estigmasterol (Figura 7).

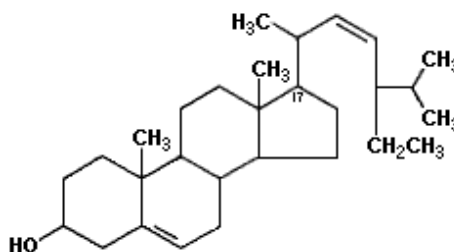


Figura 7: Estrutura química do estigmasterol

Toda a análise química desenvolvida até o momento, com as diversas partes de *C. pallida*, foram e estão sendo realizadas pela doutoranda Maria do Socorro F. Melo, do Instituto de Química da UNESP de Araraquara.

3.3. Avaliação da Mutagenicidade (Teste de Ames)

3.3.1. Linhagens utilizadas

Foram utilizadas as linhagens TA98, TA97a, TA100 e TA102 de *S. typhimurium*, cedidas pelo Dr. Bruce Ames da Universidade de Berkeley, Califórnia, USA (MYERS *et al.*; 1991).

3.3.2. Genótipo das linhagens de *S. typhimurium* (MARON e AMES, 1983):

As linhagens de *S. typhimurium* utilizadas no ensaio contêm mutações no “operon” da histidina, o que as tornam incapazes de crescer na ausência desse aminoácido, e também outras mutações que conferem às células maior sensibilidade a xenobióticos mutagênicos:

- **Mutação *rfa***: Todas as linhagens possuem esta mutação que causa perda parcial do lipopolissacarídeo da parede bacteriana favorecendo a difusão de grandes moléculas para o interior da célula.
- **Deleção *uvr B***: consiste na deleção do gene que codifica o sistema de reparo do DNA por excisão de base, o que aumenta a sensibilidade para detecção de muitos mutágenos. A deleção do gene *uvrB* se estende até o gene responsável pela síntese de biotina. Deste modo, as bactérias se tornam dependentes deste aminoácido para o crescimento. A linhagem TA102 não contém a mutação *uvrB* já que foi construída inicialmente com o propósito de detectar mutágenos que requerem um sistema de reparo por excisão intacto.
- **Introdução do plasmídeo pKM101**: o plasmídeo pKM101 contém o gene *mucAB*, aumentando assim o sistema de reparo do tipo erro prone (passível de erro), ocasionando um aumento tanto na mutagênese espontânea quanto na induzida. O plasmídeo contém gene de resistência à ampicilina, o que torna a resistência ao antibiótico como um marcador para detectar a presença do plasmídeo.

- **Plasmídeo pAQ1 na linhagem TA102:** esse plasmídeo carrega mutação *hisG428*, amplificando o número de sítios específicos para a mutagênese. Esse plasmídeo apresenta como marcador a resistência à tetraciclina.

3.3.3. Especificidade da sequência de DNA das linhagens

As diferentes linhagens apresentam mutações em diversas etapas da síntese do aminoácido histidina, tornando-as incapazes de crescer na ausência do mesmo:

- **Linhagem TA100:** Possui mutação *hisG46*, presente na primeira enzima envolvida na biossíntese de histidina, resultando na substituição de uma leucina (GAG/CTC) por uma prolina (GGG/CCC), sendo desta forma, marcador para mutágenos que causam substituição de pares de base. Na presença de um agente mutagênico que ocasiona substituição de par de base, principalmente no par GC, esta mutação é revertida, a linhagem retorna ao tipo selvagem, e, portanto, capaz de sintetizar o aminoácido, crescer e formar colônias.
- **Linhagem TA98:** Contém a mutação *D3052* no gene que codifica para a enzima histidinol desidrogenase. Esta mutação é do tipo *frameshift* (-1C) que afeta a leitura correta de uma sequência próxima (CGCGCGCG). Esta mutação pode ser revertida por agentes que causam *frameshift* como o 2-nitrofluoreno e derivados aromáticos de aminas carcinogênicas.
- **Linhagem TA97a:** Mutação *hisD6610* que detecta substâncias capazes de causar erro no quadro de leitura (+1C), tendo uma citosina adicional no sítio de mutação.
- **Linhagem TA102:** Mutação AT no sítio *hisG428*, que está inserido no plasmídeo multicópia pAQ1. A *hisG428* é uma mutação ochre TAA, a qual pode ser revertida pelas 6 possíveis modificações de pares de base levando a transições e transversões. Esta mutação confere sensibilidade a agentes oxidativos.

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

As cepas de *S. typhimurium* foram estocadas em criotubos à -70°C (0,9 mL de cultura para 0,1 mL de DMSO), afim de se manter inalteradas as características genéticas das cepas.

3.3.5. Preparo dos inóculo de *S. typhimurium* para realização do teste

Uma pequena quantidade da cultura estoque da bactéria foi inoculada em 30 mL de caldo nutriente (Oxóide n^o2) e incubada a 37°C por 14 horas, em shaker com agitação (160 rpm), a fim de se obter uma densidade de $1-2 \times 10^9$ bactérias por mL.

3.3.6. Meios de cultura e Soluções

O crescimento das linhagens de *S. typhimurium* foi realizado em caldo nutriente Oxoid n^o2.

O meio sólido utilizado para realização dos ensaios com as linhagens TA98, TA100 e TA102 foi ágar mínimo glicosado (AMG), o qual é composto de ágar glicose (20,0 g de glicose, 15,0 g de bacto ágar e 930,0 mL de água destilada) e Meio Vogel Bonner “E” concentrado 50x (10g de sulfato de magnésio heptahidratado, 100 g de ácido cítrico, 175g 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. Já para a linhagem TA97a, também foi utilizado o meio sólido AMG como já especificado, porém, preparando-o com 8% de glicose, e não mais com 40%, visto que essa linhagem possui uma sensibilidade a esse açúcar.

A preparação do ágar de superfície (“*top- agar*”) foi realizada utilizando-se 0,5 g de cloreto de sódio, 0,6 de Bacto- ágar e 100mL de água destilada. A esta solução, acrescentou-se 10 mL de uma solução de L- histidina 0,096 mg/mL (Sigma) e D-biotina 0,123 mg/mL (Sigma). Ambas as soluções foram preparadas e autoclavadas separadamente.

Todos os meios de cultura e soluções necessárias para a realização do ensaio de mutação reversa foram preparados de acordo com as especificações de Maron e Ames (1983), sendo os meios e soluções esterilizados em autoclave a 121°C por 15 minutos.

3.3.7. Controles

O controle negativo foi feito com DMSO, o qual foi utilizado como solvente das amostras. Como controles positivos foram utilizados compostos sabidamente mutagênicos. Nos ensaios sem ativação metabólica (-S9) foram utilizados os controles 4-nitro-*o*-fenilenodiamina (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 ativação metabólica (+S9) foram usados o 2- aminoantraceno (TA98, TA100 e TA97a) e o 2-aminofluoreno (TA102).

3.3.8. Ensaio com ativação metabólica (Fração S9)

Para os ensaios com metabolização enzimática, preparou-se a mistura S9 (fração MOLTOX-Molecular Toxicology, Inc. USA) obtida a partir de fígado de roedores tratados com agentes indutores de enzimas, como aroclor 1254.

As soluções utilizadas para o preparo da mistura S9 são constituídas de cloreto de magnésio 0,4 M, cloreto de potássio 0,4 M, glicose-6-fosfato 1M, β -nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato 0,1M, tampão fosfato 0,2M- pH 7,4 e água destilada. Todas as soluções envolvidas no preparo da mistura S9 foram mantidas em banho de gelo durante todo o ensaio, por um período máximo de 3 horas.

3.3.9. Realização dos ensaios de mutagenicidade

A metodologia utilizada foi a de pré-incubação, desenvolvida por Maron e Ames (1983). As concentrações foram selecionadas com base em testes preliminares de análise de toxicidade. A toxicidade das amostras foi evidenciada pela redução no número de revertentes His⁺ ou com crescimento de fundo (*background*) nas placas de ágar mínimo.

Em tubos de ensaio, adicionou-se 0,5 mL de tampão fosfato pH 7,4 ou 0,5 mL de S9 mix (4%) no caso de ensaios com ativação metabólica. Em seguida, cinco diferentes concentrações adequadas da amostra teste e por fim, 0,1mL de cultura de bactérias (1-2 x10⁹ bactérias/mL) foram acrescentadas.

Os tubos de ensaios foram incubados a 37°C durante 20 minutos. Em seguida, foram adicionados 2 mL de ágar de superfície (“*top-agar*”) acrescido de uma solução de histidina/biotina 0,05 mM na proporção de 10/100 mL. Os tubos foram submetidos à agitação em vórtex, flambados e vertidos em placas de Petri que já continham o meio mínimo glicosado. Essas placas foram incubadas por 48 horas a 37°C. Após a incubação, realizou-se a contagem das colônias revertentes. O ensaio foi realizado em triplicata.

3.3.10. Análise dos resultados

Os dados da mutagenicidade foram analisados utilizando o programa estatístico Salanal elaborado e gentilmente cedido pelo Dr. L. Myers do Research Triangle Institute, RTP, Carolina do Norte, USA. Esse programa permite a avaliação do efeito dose-resposta através do cálculo da análise de variância (ANOVA) entre as médias do número de revertentes nas diferentes doses testadas e o controle negativo, seguido de uma regressão linear. A partir dos resultados obtidos, foi calculada a razão de mutagenicidade (RM) para cada dose analisada, que é a média do número de revertentes na placa teste (espontâneos mais induzidos) dividida pela média do número de revertentes por placa do controle negativo.

$$RM = \frac{\text{número de revertentes na placa teste (induzidos mais espontâneos)}}{\text{número de revertentes na placa controle negativo (espontâneos)}}$$

A amostra é considerada positiva para o teste de Ames quando a razão de mutagenicidade (RM) for maior ou igual a 2 em pelo menos uma das doses testadas e quando houver uma relação dose resposta entre as concentrações testadas e o número de revertentes induzidos. Por sua vez, a amostra é considerada negativa para o teste de Ames, quando a mesma não induz aumento significativo no número de revertentes e seus RM forem todos menores que 2 (McGEORGE *et al.*; 1985; MORTELMAN e ZEIGER, 2000).

3.4. Ensaio para verificação da ativação de COX-2

Para a investigação da associação entre processo inflamatório (ativação de COX-2) e atividade mutagênica, foram utilizados o extrato de semente de *C. pallida* bem como a fração alcaloídica proveniente da mesma parte da planta, visto que estas foram as amostras em que a atividade mutagênica esteve mais evidente, quando avaliadas pelo teste de Ames.

Os ensaios de citotoxicidade, quantificação de nitrito e de prostaglandina foram realizados no Laboratório de Imunologia do Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP, sob a coordenação da Prof^a Dr^a Alexandra Ivo de Medeiros.

3.4.1. Manutenção de linhagens celulares

A linhagem celular utilizada para o ensaio *in vitro* de quantificação de PGE2 foi a RAW 264.7 previamente obtidas da Coleção Americana de Cultura de Células (ATCC, American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA). Os macrófagos da linhagem RAW 264.7 são macrófagos murinos transformados pela injeção intraperitoneal do vírus de leucemia Abelson, obtidos da ascite de ratos BALB/c (RASCHKE, 1978; ABELSON, 1970).

As células foram armazenadas em nitrogênio líquido em solução de congelamento composto de meio DMEMi (Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium incompleto) e 5% de DMSO . Para os ensaios de citotoxicidade e quantificação de NO e PGE2, as células foram descongeladas e expandidas em frascos de cultura celular em meio DMEM (Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium) contendo 10% SBF (soro bovino fetal) e gentamicina (1:1000) à temperatura de 37°C, em estufa incubadora umidificada contendo 5% de CO₂, conforme orientações do ATCC.

3.4.2 Meios e soluções utilizadas

O meio utilizado para o cultivo de macrófagos da linhagem RAW 264.7 foi o meio Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium (DMEM, Cultilab, Campinas, Brasil). A solução salina

tamponada (PBS) foi preparada na forma de estoque 5 vezes concentrada. Os seguintes componentes foram dissolvidos em água ultrapura: NaCl 680 mmol.L⁻¹, KCl 13,4 mmol.L⁻¹, Na₂HPO₄ 40,5 mmol.L⁻¹. O pH foi ajustado para 7,4 e o volume completado para 1 litro em balão volumétrico. A solução foi então autoclavada a 120 °C, 1 atm, por 40 minutos. A solução foi armazenada em frasco estéril e mantida sob temperatura ambiente.

3.4.3. Coleta e contagem das células

Depois de formada a monocamada celular, as células foram descoladas assepticamente utilizando “cell scraper” (TPP), seguindo-se de centrifugação e ressuspensão do “pool” celular em 1 mL de meio de cultura. A contagem das células foi feita em hemocítmetro de Neubauer, utilizando microscópio óptico.

3.4.4. Atividade Citotóxica

As amostras (extrato de semente e fração alcaloídica de semente de *C. pallida*) foram solubilizadas em DMSO e então diluídas em meio de cultura (DMEMi). A metodologia empregada foi a colorimétrica por MTT (brometo de 3-metil-[4-5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazólio) de acordo com a metodologia descrita por Reilly *et al.* (1998). Segundo o princípio do método, as células viáveis e metabolicamente ativas reduzem o sal tetrazólio por ação de desidrogenases, formando cristais de formazan solúveis em DMSO, possuindo cor roxa característica.

O potencial tóxico foi avaliado após o contato entre as amostras e a linhagem celular, por 24h a 37⁰C e tensão constante de CO₂ a 5%. O ensaio foi realizado em uma placa de 96 orifícios, onde foram acrescentados 100 µL de cultura de macrófagos contendo 5x10⁴ células/mL e 200 µL do extrato e fração de *C. pallida* nas concentrações de 3,12; 6,25; 12,5; 25,0; 50,0 e 100,0 µg/mL. Também foram adicionados os controles de meio (200 µL) e o controle positivo de lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* (LPS) a 1 µg/mL (180 µL meio e 20 µL de LPS) em orifícios pré- determinados. Foram feitos 3 experimentos independentes, realizados em quadruplicata.

Após a incubação, o sobrenadante (200 µL) foi coletado e dividido em duas placas de 96 orifícios para a posterior realização dos experimentos de quantificação de óxido nítrico (100 µL) e quantificação de PGE2 (100 µL), as quais foram armazenadas a -70°C até o momento de quantificação dos mediadores de interesse.

O ensaio de viabilidade com MTT foi realizado na própria placa após a coleta do sobrenadante, na ausência de luz, adicionando-se 160 µL de meio DMEM sem vermelho de fenol e 10 µL de MTT em cada poço, prosseguindo com uma incubação de 3h em estufa. Em seguida, adicionou-se 50 µL de dodecilsulfato de sódio (SDS) e a placa foi então, incubada por mais 24h, sendo a leitura da absorbância (595nm) realizada após essa incubação.

As diluições que apresentaram atividade citotóxica superior a 5% não foram testadas nos subsequentes bioensaios.

3.4.5. Quantificação de Óxido nítrico (NO)

Este ensaio foi realizado em placa de 96 orifícios contendo 100 µL de sobrenadante de cultura, obtida anteriormente. O sobrenadante de cultura de macrófagos foi obtido após contato entre as amostras e a linhagem celular (5×10^4 células/mL), por 24h a 37°C e tensão constante de CO₂ a 5%.

A produção de óxido nítrico foi medida pela dosagem de seus produtos de degradação, nitrito e nitrato, mais estáveis, utilizando o reagente de Griess. Neste método, o nitrito primeiramente reage com a sulfanilamida em meio ácido para formar um composto intermediário, o sal de diazônio. Em seguida, este sal reage com N-naftil-etilenodiamina (NEED) formando um composto azo estável de coloração púrpura podendo assim ser quantificado espectrofotometricamente a 550 nm (GREEN *et al.*, 1982).

Para a dosagem, 100 µL do reagente de Griess (solução estoque de NEED a 0,1% (Sigma, St. Louis, MO) e sulfanilamida a 1% em H₃PO₄ 5%) foram adicionados aos 100 µL de sobrenadante de cultura.

Após 5 minutos de incubação à temperatura ambiente, a densidade ótica da solução foi medida em leitor de microplacas em filtro de 540 nm (Metertech Inc., modelo 960). A quantificação de nitrito no sobrenadante de cultura foi correlacionada aos valores de

absorbância obtidos na curva padrão, preparada previamente com concentrações μ molares conhecidas de nitrito de sódio (3 a 200 μ M) (LANE *et al.*, 1993).

3.4.6. Quantificação dos níveis de PGE2

A prostaglandina E2 foi quantificada em sobrenadante de cultura (100 μ L) utilizando o Kit Prostaglandin E2 Express- EIA kit- monoclonal conforme instruções do fabricante (Cayman Chemical Company). O sobrenadante de cultura de macrófagos foi obtido após contato entre as amostras e a linhagem celular (5×10^4 células/mL), por 24h a 37⁰C e tensão constante de CO₂ a 5%.

Devido ao rápido metabolismo da prostaglandina, a biossíntese de PGE2 é analisada pela medida e determinação de seus metabólitos. O ensaio converte os metabólitos majoritários de PGE2 em um derivado estável (13,14- diidro-15-ceto prostaglandina A2).

O ensaio é baseado na competição entre PGE2 presente na amostra e PGE2 conjugada à acetilcolinesterase (PGE2-AchE) por uma quantidade limitada de anticorpo de PGE2 monoclonal, presente no kit. Como a concentração da PGE2-AchE é mantida constante, enquanto a concentração de PGE2 da amostra varia, a quantidade de PGE2-AchE que será capaz de se ligar ao anticorpo monoclonal de PGE2 será inversamente proporcional a concentração de PGE2 presente na amostra.

O kit possui uma placa de Elisa que já contém nos poços anticorpo policlonal anti IgG de rato, no qual o anticorpo monoclonal de PGE2 se liga. Assim, a PGE2 da amostra e a PGE2-AchE competem pela ligação com o anticorpo específico.

A placa foi lavada para remover os reagentes não ligados e então 200 μ L do reagente Ellman's foi adicionado em todos os poços. Este reagente contém a acetilcolina, a qual é substrato para acetilcolinesterase (AchE). O produto desta reação enzimática tem coloração amarela e absorve em comprimento de onda de 412 nm. A intensidade da cor, determinada espectrofotometricamente, é proporcional à quantidade de PGE2-AchE ligada ao anticorpo, a qual é inversamente proporcional a quantidade de PGE2 da amostra, presente nos poços.

A densidade ótica das soluções foi avaliada em leitor de microplacas com filtro entre 405 e 420nm e a concentração de prostaglandina foi calculada a partir da curva padrão.

3.5. Avaliação do potencial estrogênico utilizando leveduras recombinantes:

Teste RYA (Recombinat Yeast Assay)

3.5.1. Linhagem e plasmídeos utilizados

A linhagem utilizada para esse experimento foi BY4741 (MATa *ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 met15Δ0*), obtida da EUROSCARF, Frankfurt, Alemanha. Os plasmídeos utilizados foram pH5HE0, contendo o receptor de estrógeno humano (HE0), clonado no vetor de expressão constitutivo em levedura pAAH5 e pVITB2x, derivado do pSFLΔ-178k, contendo o promotor CYC1 que regula o gene da β -galactosidase em *E. coli*. O plasmídeo pVITB2x contém o elemento responsivo a estrógeno do gene vitelogenina B1 de *X. laevis* (GREEN e CHAMBON, 1989).

3.5.2. Soluções e meios utilizados

As soluções e os meios de cultura utilizados para a realização do ensaio RYA encontram-se no anexo I.

3.5.3. Controles

Como controle negativo foi utilizado o solvente da amostra (DMSO à 10%) e como controle positivo foi utilizado 17- β -estradiol (Sigma Aldrich - Brasil) a uma concentração final de 10 nM.

3.5.4. Realização dos ensaios

O teste de RYA foi realizado como descrito em Garcia-Reyero *et al.* (2005).

A levedura BY4741 transformada com os plasmídeos pH5HE0 e pVITB2x foi descongelada do estoque à - 70°C e crescida a 30°C, por 2-3 dias em meio mínimo (base nitrogenada sem aminoácidos 6,7 g/L, glicose 20 g/L) com ausência de uracila e leucina (-

Ura-Leu) suplementado dos aminoácidos prototróficos necessários (0,1 g/L de histidina e metionina). A seguir, as leveduras cresceram em meio rico YPD (extrato de levedura 5 g/L, peptona 10 g/L e glicose 20 g/L) por mais 1-2 dias. Então, 10 µL dessa cultura foram inoculados em 30 mL de meio mínimo, o qual foi incubado a 30°C até atingir densidade óptica ($D.O_{600nm}$) igual a 0,1 (NOGUEROL *et al.*, 2006)

Para o ensaio de RYA, utilizou-se uma placa de microtitulação de polipropileno de 96 poços, previamente siliconada. Adicionou-se à primeira linha, 90 µL da cultura final contendo D.O de 0,1 e 50 µL nos demais poços. Em seguida, 10 µL dos extratos de *M. hirtum* (folhas; caule) e extratos de *C. pallida* (flores; folhas, semente; pericarpo) foram adicionados à primeira linha da microplaca, em triplicata. Como os extratos de *C. pallida* mostraram-se estrogênicos decidiu-se prosseguir a análise com o ensaio RYA com as frações enriquecidas provenientes dessa planta.

A concentração inicial de cada extrato foi de 0,0125 g/mL para o extrato de folhas de *M. hirtum*, 0,0168 g/mL para o extrato de caule de *M. hirtum*, 0,0092 g/mL para o extrato de flores de *C. pallida*, 0,0123 g/mL para folhas, 0,0200 g/mL para o extrato de semente e de 0,0142 g/mL para o extrato de pericarpo de *C. pallida*. As concentrações iniciais utilizadas para as frações enriquecidas provenientes de flores de *C. pallida* foram de 0,0115 g/mL para a fração diclorometânica, 0,0106 g/mL para a clorofórmica e de 0,103 g/mL para a butanólica. Já para as frações enriquecidas de folhas de *C. pallida* as concentrações foram de 0,0341 g/mL para a fração diclorometânica, 0,0344 g/mL para a clorofórmica e de 0,0083 g/mL para a butanólica. Em relação as concentrações utilizadas para as frações diclorometânica, clorofórmica, butanólica e alcaloídica de semente, estas foram de 0,0175 g/mL; 0,0053 g/mL; 0,0858 g/mL e 0,00025 g/mL, respectivamente. Para as frações de pericarpo de *C. pallida*, as concentrações iniciais foram de 0,0325 g/mL para a fração diclorometânica, 0,0221 g/mL para a clorofórmica e de 0,0465 g/mL para a butanólica. A concentração inicial empregada para o estigmasterol foi de $0,003 \times 10^{-3}$ g/mL

Posteriormente, os extratos e frações foram submetidos a uma diluição seriada, transferindo-se 25 µL do conteúdo presente nos poços da primeira linha para o seguinte e assim sucessivamente, sendo que na última diluição, 25 µL foram descartados. Obteve-se, então, 5 concentrações diferentes para cada amostra. As concentrações testadas para o extrato de folhas *M. hirtum* variaram de 0,8 a 62,5 µg/poço e de 1,0 a 83,2 µg/poço para o extrato de

caule de *M. hirtum*. Já para os extratos de flores, folhas, semente e de pericarpo *C. pallida*, as concentrações variaram de 0,05 a 4,6; 0,8 a 61,6; 1,2 a 100 e 0,8 a 71,0 µg/poço, respectivamente. Já para as frações diclorometânica, clorofórmica e butanólica de flores de *C. pallida*, as concentrações obtidas através da diluição seriada, variaram de 0,7 a 57,5 µg/poço, 0,7 a 53,0 µg/poço e de 6,4 a 515,5 µg/poço, respectivamente. A fração diclorometânica de folhas de *C. pallida* foram testadas nas concentrações que variaram de 2,1 a 170,5 µg/poço. Já as frações clorofórmica e butanólica de folhas variaram de 2,1 a 172,0 µg/poço e de 0,6 a 41,5 µg/poço, respectivamente. Para a fração diclorometânica de semente, as concentrações testadas variaram de 1,1 a 87,3 g/mL. As concentrações testadas para a fração clorofórmica da mesma parte da planta variaram de 0,3 a 26,5 g/mL. Já para as frações butanólicas e alcaloídica, as concentrações variaram de 5,3 a 428,8 g/mL e 0,02 a 1,3 g/mL, respectivamente. Em relação às frações diclorometânica, clorofórmica e butanólica de pericarpo de *C. pallida* as concentrações variaram de 0,5 a 39 µg/poço, 2,1 a 165,0 µg/poço e 1,3 a 110 µg/poço, respectivamente. As concentrações testadas para o estigmasterol variaram de $0,002 \times 10^{-6}$ a $0,15 \times 10^{-6}$ g/mL.

Ao final, todos os poços deveriam conter um volume de 50 µL. Como o primeiro poço continha um volume inicial de 100 µL (90µL da cultura e 10 µL de extrato), ao ser transferido 25µL para o poço seguinte, ainda permanciam 75 µL neste poço. Então, mais 25 µL desta mistura foram transferidos para uma outra microplaca, a qual foi destinada ao ensaio de viabilidade da levedura.

Outras duas linhas da microplaca do teste de RYA foram destinadas aos controles negativo (DMSO a 10%) e positivo (10 nM de 17-β-estradiol).

Em seguida, as microplacas foram incubadas por 6 horas a 30°C sob agitação. Após a incubação, 50 µL de tampão de lise Yeast Protein Extraction (Y-PER, Pierce, Rockford, USA) foram adicionados a cada orifício e incubou-se a microplaca novamente na mesma temperatura por mais 30 minutos. A seguir, adicionou-se 50 µL de tampão suplementado com 0,1% de mercaptoetanol e 0,5% da solução de 4-metilumbeliferona β-D-galactopiranosídeo (MuGal).

Após breve centrifugação a 1.000 rpm, as microplacas foram lidas em espectrofotômetro (355 nm de excitação e 460 nm de emissão). A fluorescência foi medida durante 20 minutos (uma medida por minuto) e os valores da atividade da β-galactosidase

foram avaliados pelo aumento das unidades de fluorescência em relação ao tempo, usando o método de regressão linear padrão. Este ensaio quantifica a atividade estrogênica, a qual é calculada como equivalentes de estradiol (EEQ). Uma curva dose-resposta relacionando a atividade da enzima β -galactosidase com a concentração de estradiol é usada para atribuir um valor estradiol-equivalente (EEQ).

3.5.5. Ensaio de viabilidade da levedura *S. cerevisiae*

A avaliação da viabilidade foi realizada utilizando a segunda maior concentração de cada amostra. Para o extrato de folhas de *M. hirtum*, a concentração testada foi de 20,8 $\mu\text{g/poço}$ e para o extrato de caule, 27,7 $\mu\text{g/poço}$. Já para *C. pallida*, foram testados os extratos de flores, folhas, semente e pericarpo, nas respectivas concentrações 1,5; 6,8; 33,4; 23,6 $\mu\text{g/poço}$. O ensaio de viabilidade da levedura para as frações provenientes de flores de *C. pallida* foi realizado com as concentrações de 19,2 $\mu\text{g/poço}$ para a diclorometânica, 17,7 $\mu\text{g/poço}$ para a clorofórmica e de 171,8 $\mu\text{g/poço}$ para a butanólica. Para a fração diclorometânica de folhas de *C. pallida* a concentração testada foi de 56,8 $\mu\text{g/poço}$, 58,0 $\mu\text{g/poço}$ para a fração clorofórmica e 13,8 $\mu\text{g/poço}$ para a butanólica. As concentrações testadas, neste ensaio, para as frações diclorometânica, clorofórmica, butanólica e alcaloídica provenientes de semente de *C. pallida* foram de 29,1 $\mu\text{g/poço}$, 8,8 $\mu\text{g/poço}$, 142,9 $\mu\text{g/poço}$, 0,43 $\mu\text{g/poço}$, respectivamente. Já para as frações de pericarpo de *C. pallida* (diclorometânica, clorofórmica e butanólica) as concentrações testadas foram 55,0; 36,0 e 77,4 $\mu\text{g/poço}$, respectivamente. A concentração do estigmasterol testada nesse ensaio foi de $0,05 \times 10^{-6}$ $\mu\text{g/poço}$.

A mistura (50 μL de levedura + amostra) foi então diluída em 10 mL de solução salina 0,9% e após homogenização, 100 μL foram plaqueados em ágar YPD. Após 48h de incubação, procedeu-se à contagem do número de colônias e em seguida, realizou-se o cálculo de unidades formadoras de colônias (UFC), considerando como 100% o crescimento obtido nas placas contendo apenas a suspensão de levedura.

3.5.6. Análise dos resultados

A análise estatística da atividade estrogênica das amostras, avaliadas pelo teste RYA, foi realizada através do Microsoft Excel.

A fluorescência foi gravada por 20 minutos (uma medição por minuto) e os valores da atividade da β -galactosidase foram calculados pelo aumento das unidades de fluorescência em relação ao tempo, através da metodologia de regressão linear, de acordo com a seguinte equação (CÉSPEDES *et al.*, 2005):

$$\text{Unidades de } \beta\text{-galactosidase: } \frac{1000 \times A_{420}}{A_{600} (t_f - t_o)}$$

onde t_o e t_f representam os tempos iniciais e finais de incubação de cada substância com MuGal e A_{420} e A_{600} representam os valores de absorvância a 420 e 600 nm, respectivamente para cada poço (NOGUEROL *et al.*, 2006).

Os resultados foram dados em equivalente em estradiol (EEQ), que é definido como a concentração de estradiol que induz a mesma resposta que a amostra no ensaio RYA. Para traduzir os resultados em EEQ, a partir das diluições seriadas, assumimos que as curvas dose-resposta hormonais seguem uma função sigmoidal:

$$\frac{R - R_o}{R_{\max} - R_o} = \frac{1}{1 + \frac{K_d}{[L]}}$$

onde R_o representa as unidades de β -galactosidase obtidas sem ligante (ou substância teste), R as unidades de β -galactosidase obtidas na concentração do ligante (L) e R_{\max} as unidades de β -galactosidase obtidas na concentração do ligante saturante. K_d representa a constante de dissociação do complexo hormônio-ligante, e seu valor coincide com o EC_{50} , a concentração de ligante que tenha 50% da resposta máxima (CÉSPEDES *et al.*, 2005).

A partir dos dados disponíveis obteve-se os valores de EEQ geral (nM) \pm DP (média de 3 experimentos independentes realizados em triplicata). Em seguida, com todas as leituras disponíveis obteve-se um gráfico de cinética mostrando o comportamento das amostras em função do tempo.

Foram considerados resultados importantes para o teste RYA as amostras que forneceram valores altos de EEQ (nM) e apresentaram resultados significativos de ativação da enzima β -glactosidade, quando comparados aos resultados obtidos pelo controle negativo, em pelo menos uma das concentrações testadas.

Além disso, foram calculados os valores de EC50 (concentração da amostra que equivale a 50% da atividade do 17- β -estradiol) :

$$EC50 = \frac{\text{Concentração inicial (solução mãe)}}{\text{Fator de diluição (Kd)}}$$

4. RESULTADOS

4.1. Ensaio de mutagenicidade com extratos de *M. hirtum*

Os dados da avaliação da mutagenicidade do extrato metanólico de caule de *M. hirtum* estão dispostos na Tabela 1. Verificou-se que esse extrato não apresentou atividade mutagênica em nenhuma das concentrações testadas (1,0; 2,8; 5,5; 8,3 e 11,0 mg/placa), tanto na presença (+S9) quanto na ausência de metabolização (-S9).

Os resultados referentes ao ensaio de mutagenicidade para o extrato etanólico de folhas de *M. hirtum* encontram-se na Tabela 2. As concentrações analisadas foram de 0,8; 2,0; 4,0; 6,0 e 8,0 mg/placa para as linhagens TA97a, TA102 e TA100. Já para a linhagem TA98, foram utilizadas as concentrações de 1,6; 4,0; 8,0; 12,0 e 16,0 mg/placa. Não foi observada atividade mutagênica para o extrato etanólico de folhas de *M. hirtum*, em nenhuma das linhagens e concentrações testadas, tanto na ausência (-S9) quanto na presença de metabolização (+S9).

4.2. Ensaio de mutagenicidade com extratos de *C. pallida*

Na Tabela 3 foram dispostos os resultados referentes ao ensaio de mutagenicidade realizado com o extrato etanólico de flores de *C. pallida*. Esse extrato foi avaliado nas concentrações 0,8; 2,0; 4,0; 6,0 e 8,0 mg/placa para as linhagens TA97a, TA102 e TA100. Já para a linhagem TA98, as concentrações testadas foram 1,5; 3,8; 7,5; 11,3 e 15,0 mg/placa. Verificou-se que tanto na ausência (-S9) quanto na presença de metabolização (+S9), a mutagenicidade foi considerada negativa para todas as linhagens testadas.

O extrato de folhas de *C. pallida* foi testado nas concentrações 0,7; 1,9; 3,7; 5,6 e 7,4 mg/placa para as linhagens TA97a e TA102 de *S. typhimurium*. Para a linhagem TA98, as concentrações utilizadas foram 1,8; 4,5; 9,0; 13,5 e 18,0 mg/placa. Já para a linhagem TA100, foram testadas as concentrações de 0,9; 2,3; 4,5; 6,8 e 9,0 mg/placa.

De acordo com a Tabela 4, verificou-se que a atividade mutagênica foi considerada negativa frente às linhagens TA97a, TA102 e TA100, em todas as concentrações testadas,

tanto na ausência de metabolização quanto na presença. Em contrapartida, pode-se observar que o extrato foi mutagênico para a linhagem TA98, nas concentrações 9,0 e 13,5 mg/placa, quando na ausência de metabolização, onde se observa uma razão de mutagenicidade (RM) maior que 2, além de uma relação dose-resposta.

Na Tabela 5 estão dispostos os resultados do ensaio de mutagenicidade do extrato etanólico de semente de *C. pallida*. Para as linhagens TA97a e TA102 as concentrações analisadas foram 1,7; 4,3; 8,5; 12,8 e 17,0 mg/placa. Foi observada mutagenicidade positiva, quando na presença de metabolização, em ambas as linhagens testadas, sendo as concentrações 8,5; 12,3 e 17,0 mg/placa consideradas mutagênicas para a linhagem TA97a e 12,3 mg/placa para a linhagem TA102.

A Tabela 5 mostra ainda, os resultados referentes às linhagens TA100 e TA98. Para a TA98 a mutagenicidade foi considerada positiva tanto na ausência quanto na presença de metabolização. Já para a linhagem TA100, a atividade mutagênica foi positiva apenas em uma das concentrações, 9,0 mg/placa, quando na ausência de metabolização.

Os resultados da atividade mutagênica do extrato etanólico de pericarpo de *C. pallida* foram dispostos na Tabela 6. As concentrações testadas para este extrato variaram de 1,0 a 8,0 mg/placa para as linhagens TA97a e TA102 e de 1,3 a 12,5 mg/placa para as linhagens TA100 e TA 98. Não foi observado resultados positivos de mutagenicidade para nenhuma das linhagens, em nenhuma das concentrações testadas.

4.3. Ensaio de mutagenicidade com frações obtidas do extrato de semente de *C. pallida*

Como o extrato de semente apresentou maior atividade mutagênica para a linhagem TA98, na presença e ausência da mistura S9, a atividade mutagênica das frações, obtidas a partir deste extrato, foi testada na mesma condição, ou seja, frente à linhagem TA98, na presença e ausência de metabolização.

A Tabela 7 traz os resultados referentes ao teste de Ames realizado com a fração alcaloídica proveniente do extrato de semente de *C. pallida*. Conforme observado, a amostra foi considerada positiva em 3 das concentrações testadas (12,5; 18,8 e 25,0 mg/placa), quando na ausência de metabolização. O mesmo não ocorre na presença de metabolização, visto que

não foi observada, em nenhuma das concentrações testadas, uma razão de mutagenicidade (RM) maior que 2.

Os resultados do teste de Ames para a fração diclorometânica, utilizando a linhagem TA98, estão dispostos na Tabela 8. As concentrações testadas para fração variaram de 0,2 a 1,7 mg/placa, não sendo verificada nenhuma razão de mutagenicidade (RM) maior que 2.

Para a realização do teste de Ames com a fração clorofórmica foram utilizadas as seguintes concentrações: 0,05; 0,1; 0,3; 0,4 e 0,5 mg/placa. Essa fração não foi mutagênica para a linhagem TA98, em nenhuma das concentrações testadas, na ausência e presença de metabolização (Tabela 8).

A Tabela 8 mostra os resultados do ensaio de mutagenicidade para a fração butanólica, testada frente à linhagem TA98 na presença e ausência da fração S9. Conforme disposto na Tabela, não foi verificada atividade mutagênica para nenhuma das concentrações testadas (0,9; 2,1; 4,3; 6,4 e 8,6 mg/placa) tanto na presença quanto na ausência de metabolização enzimática.

4.4. Ensaio de mutagenicidade com frações enriquecidas obtidas do extrato de folhas de *C. pallida*

Como o extrato de folhas mostrou-se mutagênico para a linhagem TA98 na ausência de ativação metabólica, testou-se a atividade mutagênica das frações provenientes deste extrato, nas mesmas condições, ou seja, frente à linhagem TA98 sem a mistura S9.

As frações diclorometânica e clorofórmica de folhas de *C. pallida* teve o potencial mutagênico avaliado pelo teste de Ames nas concentrações 0,3; 0,9; 1,7; 2,6 e 3,4 mg/placa. Como apresentado na Tabela 9, a fração diclorometânica não apresentou atividade mutagênica em nenhuma das concentrações analisadas, ao contrário do observado para a fração clorofórmica que obteve resultados positivos no teste de Ames, sendo observada uma razão de mutagenicidade maior que 2 na concentração de 2,6 mg/placa.

A fração butanólica de folhas de *C. pallida* foi testada quanto seu potencial mutagênico para a linhagem TA 98, nas concentrações 0,1; 0,2; 0,4; 0,6 e 0,8 mg/placa. Não foi observada atividade mutagênica em nenhuma das concentrações testadas (Tabela 9).

4.5. Ensaio de mutagenicidade com estigmasterol, substância isolada da fração diclorometânica de folhas de *C. pallida*

O estigmasterol teve sua atividade mutagênica avaliada pelo teste de Ames frente à linhagem TA98, na presença e ausência de metabolização enzimática. O ensaio foi realizado utilizando cinco diferentes concentrações: 0,02; 0,04; 0,09; 0,18 e 0,50 mg/placa. Como disposto na Tabela 10 não foi observada razão de mutagenicidade maior que 2.

Tabela 1: Avaliação da atividade mutagênica expressa pelo número de revertentes/placa \pm desvio padrão e razão de mutagenicidade (RM) do extrato metanólico de caule de *M. hirtum* em linhagens de *S. typhimurium* na ausência de metabolização (-S9) e presença de metabolização (+S9)

Extrato de caule de <i>Machaerium hirtum</i>									
Tratamento mg/placa	TA97a		TA102		TA100		TA98		
	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	
DMSO	121 \pm 3	176 \pm 18	223 \pm 4	158 \pm 9	110 \pm 0,6	135 \pm 5	23 \pm 3	29 \pm 4	
1,0	96 \pm 18 (0,8)	265 \pm 9 (1,5)	264 \pm 4 (1,2)	217 \pm 3 (1,4)	113 \pm 6 (1,0)	131 \pm 2 (1,0)	23 \pm 3 (1,0)	31 \pm 3 (1,1)	
2,8	115 \pm 17 (1,0)	245 \pm 5 (1,4)	289 \pm 9 (1,3)	218 \pm 5 (1,4)	141 \pm 1 (1,3)	140 \pm 10 (1,0)	30 \pm 6 (1,3)	30 \pm 3 (1,1)	
5,5	132 \pm 10 (1,1)	213 \pm 12 (1,2)	260 \pm 9 (1,2)	201 \pm 1 (1,3)	167 \pm 23 (1,5)	123 \pm 7 (0,9)	24 \pm 2 (1,0)	22 \pm 2 (0,8)	
8,3	83 \pm 63 (0,7)	191 \pm 11 (1,1)	259 \pm 4 (1,2)	189 \pm 6 (1,2)	153 \pm 10 (1,4)	122 \pm 4 (0,9)	33 \pm 6 (1,4)	23 \pm 1 (0,8)	
11,0	145 \pm 5 (1,2)	180 \pm 5 (1,0)	260 \pm 1 (1,2)	132 \pm 2 (0,8)	168 \pm 2 (1,5)	113 \pm 4 (0,8)	34 \pm 6 (1,4)	23 \pm 1 (0,8)	
Controle +	1044 \pm 53 ^a	2648 \pm 59 ^b	1840 \pm 116 ^c	1075 \pm 22 ^d	1312 \pm 60 ^e	1956 \pm 92 ^b	1050 \pm 39 ^a	1929 \pm 57 ^b	

DMSO: 100 μ L/placa (Controle negativo); Controle +: ^a 4-nitro-*o*-fenilenediamina - 10 μ g/placa; ^b 2- Aminoantraceno- 1,25 μ g/placa; +: ^c Mitomicina 0,5 μ g/placa; ^d Aminofluorene 1,25 μ g/placa; +: ^e azida sódica -1,25 μ g/placa.

Tabela 2: Avaliação da atividade mutagênica expressa pelo número de revertentes/placa \pm desvio padrão e razão de mutagenicidade (RM) do extrato etanólico de folhas de *M. hirtum* em linhagens de *S. typhimurium* na ausência de metabolização (-S9) e presença de metabolização (+S9)

Extrato de folhas de <i>Machaerium hirtum</i>									
Tratamento mg/placa	TA97a		TA102		TA100		TA98		
	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	
DMSO	108 \pm 4	140 \pm 21	170 \pm 6	196 \pm 10	110 \pm 0,6	185 \pm 6	43 \pm 2	20 \pm 4	
0,8	152 \pm 0,6 (1,4)	180 \pm 18 (1,3)	151 \pm 10 (0,9)	230 \pm 17 (1,2)	126 \pm 8 (1,1)	232 \pm 14 (1,3)	43 \pm 8 (1,0)	22 \pm 4 (1,1)	
2,0	128 \pm 2 (1,2)	183 \pm 12 (1,3)	171 \pm 3 (1,0)	234 \pm 11 (1,2)	110 \pm 7 (1,0)	225 \pm 3 (1,2)	51 \pm 8 (1,2)	17 \pm 3 (0,8)	
4,0	113 \pm 16 (1,0)	144 \pm 11 (1,0)	172 \pm 3 (1,0)	211 \pm 2 (1,1)	111 \pm 7 (1,0)	207 \pm 10 (1,1)	61 \pm 8 (1,4)	16 \pm 2 (0,8)	
6,0	94 \pm 9 (0,9)	145 \pm 2 (1,0)	175 \pm 7 (1,0)	192 \pm 3 (1,0)	116 \pm 0,6 (1,1)	196 \pm 9 (1,1)	71 \pm 0 (1,6)	18 \pm 6 (0,9)	
8,0	99 \pm 4 (0,9)	139 \pm 9 (1,0)	188 \pm 5 (1,1)	182 \pm 2 (0,9)	100 \pm 0,6 (0,9)	161 \pm 14 (0,9)	50 \pm 3 (1,2)	24 \pm 6 (1,2)	
Controle +	1488 \pm 18 ^a	2253 \pm 56 ^b	1720 \pm 26 ^c	1168 \pm 28 ^d	1312 \pm 60 ^e	119 5 \pm 157 ^b	1050 \pm 39 ^a	1063 \pm 24 ^b	

DMSO: 100 μ L/placa (Controle negativo); Controle +: ^a 4-nitro-*o*-fenilenediamina - 10 μ g/placa; ^b 2- Aminoantraceno- 1,25 μ g/placa; +: ^c Mitomicina 0,5 μ g/placa; ^d Aminofluorene 1,25 μ g/placa; +: ^e azida sódica -1,25 μ g/placa.

Tabela 3: Avaliação da atividade mutagênica expressa pelo número de revertentes/placa \pm desvio padrão e razão de mutagenicidade (RM) do extrato etanólico de flores de *C. pallida* em linhagens de *S. typhimurium* na ausência de metabolização (-S9) e presença de metabolização (+S9)

Extrato de flores de <i>Crotalaria pallida</i>									
Tratamento mg/placa	TA97a		TA102		TA100		TA98		Tratamento mg/placa
	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	
DMSO	108 \pm 4	140 \pm 21	170 \pm 6	196 \pm 10	110 \pm 0,6	185 \pm 6	43 \pm 2	20 \pm 4	DMSO
0,8	124 \pm 10 (1,1)	173 \pm 3 (1,2)	137 \pm 3 (0,8)	278 \pm 8 (1,4)	204 \pm 2 (1,9)	231 \pm 7 (1,2)	65 \pm 0,6 (1,5)	20 \pm 4 (1,0)	1,5
2,0	113 \pm 2 (1,0)	232 \pm 1 (1,7)	173 \pm 3 (1,0)	287 \pm 12 (1,5)	179 \pm 6 (1,6)	255 \pm 14 (1,4)	57 \pm 7 (1,3)	20 \pm 2 (1,0)	3,8
4,0	100 \pm 7 (0,9)	201 \pm 5 (1,4)	223 \pm 16 (1,3)	288 \pm 9 (1,5)	155 \pm 5 (1,4)	294 \pm 5 (1,6)	71 \pm 3 (1,7)	20 \pm 2 (1,0)	7,5
6,0	79 \pm 10 (0,7)	181 \pm 8 (1,3)	251 \pm 3 (1,5)	289 \pm 6 (1,5)	88 \pm 3 (0,8)	224 \pm 3 (1,2)	53 \pm 12 (1,2)	17 \pm 0,6 (0,8)	11,3
8,0	103 \pm 10 (1,0)	143 \pm 12 (1,0)	302 \pm 10 (1,8)	307 \pm 20 (1,6)	89 \pm 7 (0,8)	198 \pm 8 (1,0)	49 \pm 0 (1,1)	18 \pm 2 (0,9)	15,0
Controle +	1488 \pm 18 ^a	2253 \pm 56 ^b	1720 \pm 26 ^c	1168 \pm 28 ^d	1312 \pm 60 ^e	1195 \pm 157 ^b	1050 \pm 39 ^a	1063 \pm 24 ^b	Controle +

DMSO: 100 μ L/placa (Controle negativo); Controle +: ^a 4-nitro-*o*-fenilenodiamina - 10 μ g/placa; ^b 2- Aminoantraceno- 1,25 μ g/placa; +: ^c Mitomicina 0,5 μ g/placa; ^d Aminofluorene 1,25 μ g/placa; +: ^e azida sódica -1,25 μ g/placa.

Tabela 4: Avaliação da atividade mutagênica expressa pelo número médio de revertentes/placa \pm desvio padrão e razão de mutagenicidade (RM) do extrato etanólico das folhas de *C. pallida* em linhagens de *S. typhimurium*, na ausência (-S9) e na presença de metabolização (+S9)

Extrato de folhas de <i>Crotalaria pallida</i>									
Tratamento mg/placa	TA97a		TA102		TA100		TA98		Tratamento mg/placa
	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	
DMSO	108 \pm 4	140 \pm 21	170 \pm 6	196 \pm 10	110 \pm 0,6	185 \pm 6	43 \pm 2	20 \pm 4	DMSO
0,7	129 \pm 14 (1,2)	177 \pm 12 (1,3)	150 \pm 24 (0,9)	224 \pm 6 (1,1)	122 \pm 2 (1,1)	237 \pm 13 (1,3)	51 \pm 0 (1,2)	18 \pm 2 (0,9)	1,8
1,9	119 \pm 4 (1,1)	164 \pm 2 (1,2)	143 \pm 5 (0,8)	251 \pm 5 (1,3)	106 \pm 7 (1,0)	295 \pm 51 (1,1)	65 \pm 8 (1,5)	18 \pm 1 (0,9)	4,5
3,7	109 \pm 5 (1,0)	141 \pm 5 (1,0)	146 \pm 6 (0,9)	275 \pm 19 (1,4)	145 \pm 5 (1,3)	203 \pm 3 (1,1)	95 \pm 13* (2,2)	17 \pm 2 (0,9)	9,0
5,6	97 \pm 3 (0,9)	134 \pm 12 (1,0)	128 \pm 5 (0,8)	265 \pm 8 (1,4)	118 \pm 6 (1,1)	222 \pm 8 (1,2)	95 \pm 22* (2,2)	21 \pm 2 (1,0)	13,5
7,4	117 \pm 6 (1,1)	174 \pm 4 (1,2)	194 \pm 5 (1,1)	219 \pm 2 (1,1)	83 \pm 5 (0,8)	167 \pm 36 (0,9)	77 \pm 12 (1,8)	19 \pm 1 (0,9)	18,0
Controle +	1488 \pm 18 ^a	2253 \pm 56 ^b	1720 \pm 26 ^c	1168 \pm 28 ^d	1312 \pm 60 ^e	1195 \pm 157 ^b	1050 \pm 39 ^a	1063 \pm 24 ^b	Controle +

DMSO: 100 μ L/placa (Controle negativo); Controle +: ^a 4-nitro-*o*-fenilenodiamina - 10 μ g/placa; ^b 2- Aminoantraceno- 1,25 μ g/placa; +: ^c Mitomicina 0,5 μ g/placa; ^d Aminofluorene 1,25 μ g/placa; +: ^e azida sódica -1,25 μ g/placa. *P<0,05.

Tabela 5: Avaliação da atividade mutagênica expressa pelo número médio de revertentes/placa \pm desvio padrão e razão de mutagenicidade (RM) do extrato etanólico de semente de *C. pallida* em linhagens de *S. typhimurium*, na ausência (-S9) e na presença de metabolização (+S9)

Extrato de semente de <i>Crotalaria pallida</i>											
Tratamento mg/placa	TA97a		TA102		TA100		TA100		TA98		
	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	
DMSO	108 \pm 4	140 \pm 21	170 \pm 6	196 \pm 10	DMSO	110 \pm 0,6	185 \pm 6	DMSO	43 \pm 2	20 \pm 4	
1,7	166 \pm 14 (1,5)	241 \pm 11 (1,7)	246 \pm 5 (1,4)	244 \pm 14 (1,2)	1,8	140 \pm 8 (1,3)	253 \pm 12 (1,4)	3,6	57 \pm 4 (1,3)	36 \pm 4 (1,8)	
4,3	172 \pm 7 (1,6)	245 \pm 6 (1,8)	226 \pm 4 (1,3)	284 \pm 8 (1,4)	4,5	166 \pm 9 (1,5)	265 \pm 4 (1,4)	9,0	71 \pm 7 (1,7)	66 \pm 2** (3,3)	
8,5	170 \pm 2 (1,6)	328 \pm 1** (2,3)	209 \pm 5 (1,2)	275 \pm 4 (1,4)	9,0	308 \pm 13** (2,8)	281 \pm 3 (1,5)	18,0	123 \pm 1** (2,9)	104 \pm 4** (5,2)	
12,8	155 \pm 3 (1,4)	324 \pm 24** (2,3)	244 \pm 7 (1,4)	391 \pm 11** (2,0)	11,25	130 \pm 6 (1,2)	267 \pm 12 (1,4)	27,0	168 \pm 1** (3,9)	148 \pm 1** (7,4)	
17,0	158 \pm 8 (1,5)	404 \pm 17** (2,9)	259 \pm 15 (1,5)	360 \pm 10 (1,8)	18,0	91 \pm 6 (0,8)	258 \pm 28 (1,4)	36,0	131 \pm 18** (3,0)	168 \pm 8** (8,4)	
Controle +	1488 \pm 18 ^a	2253 \pm 56 ^b	1720 \pm 26 ^c	1168 \pm 28 ^d	Controle +	1312 \pm 60 ^e	1195 \pm 157 ^b	Controle +	1050 \pm 39 ^a	1063 \pm 24 ^b	

DMSO: 100 μ L/placa (Controle negativo); Controle +: 4-nitro-*o*-fenilenodiamina - 10 μ g/placa; ^b 2- Aminoantraceno- 1,25 μ g/placa; +: ^c Mitomicina 0,5 μ g/placa; ^d Aminofluorene 1,25 μ g/placa; +: ^e azida sódica -1,25 μ g/placa. ** P<0,01

Tabela 6: Avaliação da atividade mutagênica expressa pelo número médio de revertentes/placa \pm desvio padrão e razão de mutagenicidade (RM) do extrato etanólico de pericarpo de *C. pallida* nas linhagens de *S. typhimurium*, na ausência (-S9) e na presença de metabolização (+S9)

Extrato de pericarpo de <i>Crotalaria pallida</i>											
Tratamento mg/placa	TA97a		TA102		TA100		TA100		TA98		
	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	
DMSO	185 \pm 8	188 \pm 11	431 \pm 13	283 \pm 5	DMSO	95 \pm 2	116 \pm 4	DMSO	18 \pm 2	23 \pm 2	
1,7	184 \pm 4 (1,0)	312 \pm 2 (1,7)	439 \pm 18 (1,0)	290 \pm 17 (1,0)	1,3	90 \pm 6 (0,9)	150 \pm 8 (1,3)	1,3	19 \pm 3 (1,1)	28 \pm 2 (1,2)	
2,0	117 \pm 3 (0,6)	303 \pm 11 (1,6)	532 \pm 32 (1,2)	287 \pm 15 (1,0)	3,1	90 \pm 2 (0,9)	201 \pm 11 (1,7)	3,1	21 \pm 1 (1,2)	36 \pm 6 (1,6)	
4,0	146 \pm 6 (0,8)	274 \pm 12 (1,5)	396 \pm 6 (0,9)	264 \pm 15 (0,9)	6,3	86 \pm 7 (0,9)	192 \pm 3 (1,7)	6,3	20 \pm 0,6 (1,1)	28 \pm 3 (1,2)	
6,0	141 \pm 1 (0,8)	206 \pm 6 (1,1)	499 \pm 3 (1,2)	236 \pm 14 (0,8)	9,4	87 \pm 6 (0,9)	225 \pm 3 (1,9)	9,4	21 \pm 2 (1,2)	26 \pm 1 (1,1)	
8,0	132 \pm 9 (0,7)	180 \pm 5 (1,0)	487 \pm 25 (1,1)	279 \pm 39 (1,0)	12,5	87 \pm 1 (0,9)	226 \pm 6 (1,9)	12,5	20 \pm 2 (1,1)	26 \pm 0,6 (1,1)	
Controle +	1515 \pm 79 ^a	2059 \pm 103 ^b	1842 \pm 63 ^c	1667 \pm 60 ^d	Controle +	1312 \pm 60 ^e	1195 \pm 157 ^b	Controle +	1700 \pm 48 ^a	1131 \pm 75 ^b	

DMSO: 100 μ L/placa (Controle negativo); Controle +: 4-nitro-*o*-fenilenodiamina - 10 μ g/placa; ^b 2- Aminoantraceno- 1,25 μ g/placa; +: ^c Mitomicina 0,5 μ g/placa; ^d Aminofluorene 1,25 μ g/placa; +: ^e azida sódica -1,25 μ g/placa.

Tabela 7: Avaliação da atividade mutagênica expressa pelo número médio de revertentes/placa \pm desvio padrão e razão de mutagenicidade (RM) da fração alcaloídica do extrato de semente de *C. pallida* na linhagem TA98, na ausência (-S9) e presença (+S9) de metabolização

		Fração alcaloídica	
Tratamento		TA98	
mg/placa		-S9	+S9
DMSO		18 \pm 1	23 \pm 4
2,5		23 \pm 3 (1,3)	27 \pm 3 (1,2)
6,3		21 \pm 1 (1,2)	30 \pm 1 (1,3)
12,5		40 \pm 1* (2,0)	37 \pm 6 (1,6)
18,8		39 \pm 11*(2,0)	38 \pm 2 (1,6)
25,0		36 \pm 3* (2,0)	27 \pm 5 (1,2)
Controle +		1115 \pm 98 ^a	1232 \pm 32 ^b

DMSO: 100 μ L/placa (Controle negativo); Controle +: ^a 4-nitro-*o*-fenilendiamina - 10 μ g/placa;

^b 2- Aminoantraceno- 1,25 μ g/placa. *P<0,05

Tabela 8: Avaliação da atividade mutagênica expressa pelo número médio de revertentes/placa \pm desvio padrão e razão de mutagenicidade (RM) das frações diclorometânica, clorofórmica e butanólica provenientes do extrato de semente de *C. pallida* na linhagem TA98 na ausência (-S9) e na presença de metabolização (+S9)

Linhagem TA98							
Tratamento		Fração diclorometânica		Fração clorofórmica		Fração butanólica	
mg/placa		-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9
DMSO		54 \pm 3	25 \pm 4	54 \pm 3	25 \pm 4	54 \pm 3	25 \pm 4
0,2		56 \pm 1 (1,0)	25 \pm 1 (1,0)	69 \pm 2 (1,3)	25 \pm 3 (1,0)	61 \pm 4 (1,2)	24 \pm 1 (1,0)
0,4		63 \pm 2 (1,2)	33 \pm 2 (1,3)	69 \pm 0,6 (1,3)	20 \pm 2 (0,8)	66 \pm 2 (1,2)	23 \pm 4 (0,9)
0,9		64 \pm 5 (1,2)	29 \pm 4 (1,2)	60 \pm 3 (0,6)	28 \pm 3 (1,1)	77 \pm 3 (1,4)	21 \pm 2 (0,8)
1,3		67 \pm 5 (1,2)	29 \pm 2 (1,2)	71 \pm 7 (1,3)	26 \pm 4 (1,0)	52 \pm 5 (1,0)	25 \pm 5 (1,0)
1,7		64 \pm 4 (1,2)	29 \pm 2 (1,2)	76 \pm 7 (1,5)	24 \pm 1 (1,0)	60 \pm 3 (1,1)	23 \pm 4 (0,9)
Controle +		896 \pm 47 ^a	1107 \pm 35 ^b	896 \pm 47 ^a	1107 \pm 35 ^b	896 \pm 47 ^a	1107 \pm 35 ^b

DMSO: 100 μ L/placa (Controle negativo); Controle +: ^a 4-nitro-*o*-fenilendiamina - 10 μ g/placa; ^b 2- Aminoantraceno- 1,25 μ g/placa.

Tabela 9: Avaliação da atividade mutagênica expressa pelo número médio de revertentes/placa \pm desvio padrão e razão de mutagenicidade (RM) das frações diclorometânica, clorofórmica e butanólica provenientes do extrato de folhas de *C. pallida* na linhagem TA98 na ausência de atividade metabólica (-S9)

Linhagem TA98 -S9					
Tratamento mg/placa	Fração Diclorometânica	Tratamento mg/placa	Fração Clorofórmica	Tratamento mg/placa	Fração Butanólica
DMSO	14 \pm 3	DMSO	14 \pm 3	DMSO	14 \pm 3
0,3	19 \pm 2 (1,4)	0,3	24 \pm 2 (1,7)	0,1	13 \pm 3 (0,9)
0,9	15 \pm 2 (1,1)	0,9	17 \pm 4 (1,2)	0,2	13 \pm 0,6 (0,9)
1,7	15 \pm 2 (1,1)	1,7	17 \pm 4 (1,2)	0,4	17 \pm 2 (1,2)
2,6	17 \pm 3 (1,2)	2,6	28 \pm 1** (2,0)	0,6	17 \pm 3 (1,2)
3,4	19 \pm 4 (1,4)	3,4	21 \pm 6 (1,5)	0,8	20 \pm 1 (1,4)
Controle+	751 \pm 96 ^a	Controle+	751 \pm 96 ^a	Controle+	751 \pm 96 ^a

DMSO: 100 μ L/placa (Controle negativo); Controle +: ^a 4- nitro-*o*- fenilenodiamina- 10 μ g/placa. **P<0,01.

Tabela 10: Avaliação da atividade mutagênica expressa pelo número médio de revertentes/placa \pm desvio padrão e razão de mutagenicidade (RM) do estigmasterol, substância isolada, proveniente da fração diclorometânica de folhas de *C. pallida* na linhagem TA98 na ausência (-S9) e presença de metabolização (+S9)

Estigmasterol		
Tratamento mg/placa	TA 98	
	- S9	+ S9
DMSO	16 \pm 2	25 \pm 2
0,02	16 \pm 3 (1,0)	31 \pm 4 (1,2)
0,04	17 \pm 2 (1,1)	23 \pm 4 (0,9)
0,09	15 \pm 1 (0,9)	27 \pm 2 (1,1)
0,18	17 \pm 0 (1,1)	22 \pm 1 (0,9)
0,5	19 \pm 1 (1,2)	30 \pm 5 (1,2)
Controle +	815 \pm 21 ^a	1531 \pm 36 ^b

DMSO: 80 μ L/placa (Controle negativo); Controle +: ^a 4-nitro-*o*-fenilenodiamina - 10 μ g/placa; ^b 2 Aminoantraceno- 1,25 μ g/placa.

4.6. Verificação da ativação de COX-2: Quantificação de NO e PGE2

Os ensaios para quantificação de NO e PGE2 foram realizados com as duas amostras que se mostraram mais mutagênicas quando avaliadas pelo ensaio de Ames: extrato de semente e fração alcaloídica de semente de *C. pallida*.

4.6.1. Atividade citotóxica

Não foram observados sinais de citotoxicidade das amostras (extrato de semente e fração alcaloídica de semente de *C. pallida*) para a linhagem celular, visto que nenhum dos tratamentos apresentou citotoxicidade maior que 5%.

4.6.2. Ensaio para a quantificação de NO

A quantificação de NO foi realizada a fim de se obter informações preliminares a respeito das amostras serem ou não capazes de estimular o sistema imunológico.

4.6.2.1. Quantificação de NO com extrato de semente de C. pallida

As diferentes concentrações do extrato de semente foram testadas quanto à sua capacidade em estimular a produção de NO. Os resultados obtidos pela amostra foram comparados aos resultados apresentados pelos controles negativo (meio) e positivo (LPS). Como observado na Figura 8, nenhuma das concentrações do extrato testadas foi capaz de estimular significativamente a produção de NO.

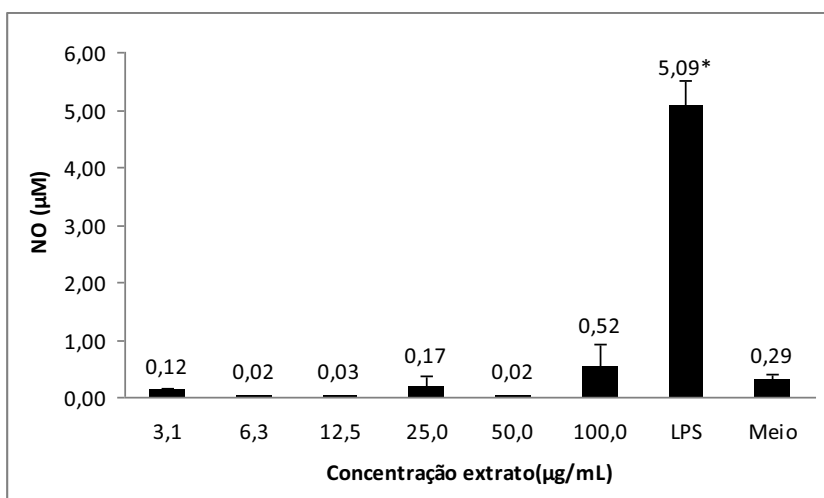


Figura 8: Produção de NO em cultura de macrófagos RAW.264, na presença de cinco concentrações do extrato de semente de *C. pallida*, de 3 experimentos independentes, realizados em quadruplicata. (Controle negativo: Meio DMEM; Controle positivo: lipopolissacarídeo de *E. coli*- LPS- 1µg/mL). * $p < 0,05$ vs meio (controle negativo) (ANOVA seguido de Bonferroni).

4.6.2.2. Quantificação de NO com fração alcaloídica de semente de *C. pallida*

O resultado do ensaio para quantificação de NO para as diferentes concentrações testadas da fração alcaloídica foram dispostos na Figura 9. Nota-se que não houve produção significativa de NO em nenhuma das concentrações testadas da fração.

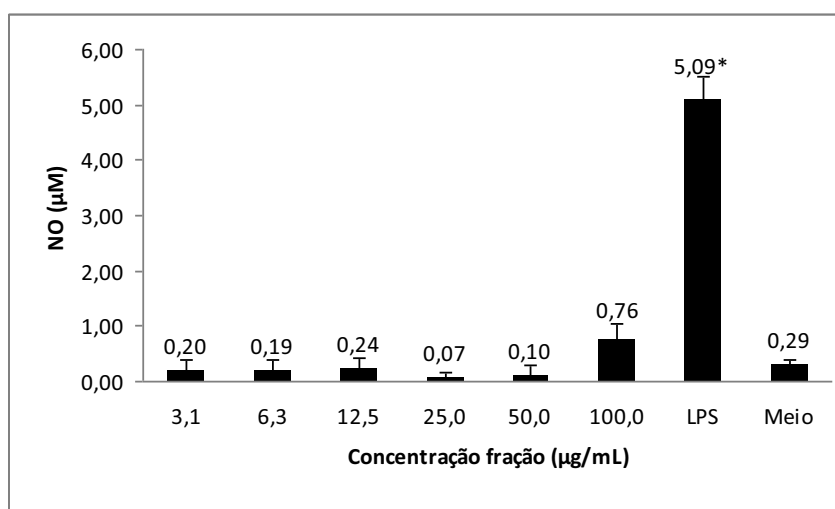


Figura 9: Produção de NO em cultura de macrófagos RAW.264, na presença de cinco concentrações da fração alcaloídica de semente de *C. pallida*, de 3 experimentos independentes, realizados em quadruplicata. Controle negativo: Meio DMEM; Controle positivo: lipopolissacarídeo de *E. coli*- LPS- 1µg/mL). * $p < 0,05$ vs meio (controle negativo) (ANOVA seguido de Bonferroni).

4.6.3. Ensaio para quantificação de PGE2

O ensaio para quantificação de PGE2 foi realizado para se obter uma medida indireta da ativação de COX-2.

4.6.3.1. Quantificação de PGE2 com extrato de semente de *C. pallida*

As diferentes concentrações do extrato de semente foram testadas quanto à sua capacidade em estimular a produção de PGE2. Os resultados da quantificação de PGE2 da amostra foram comparados aos resultados obtidos pelos controles negativo (meio) e positivo (LPS). Como observado na Figura 10, nenhuma das concentrações do extrato testadas foi capaz de estimular significativamente a produção de PGE2.

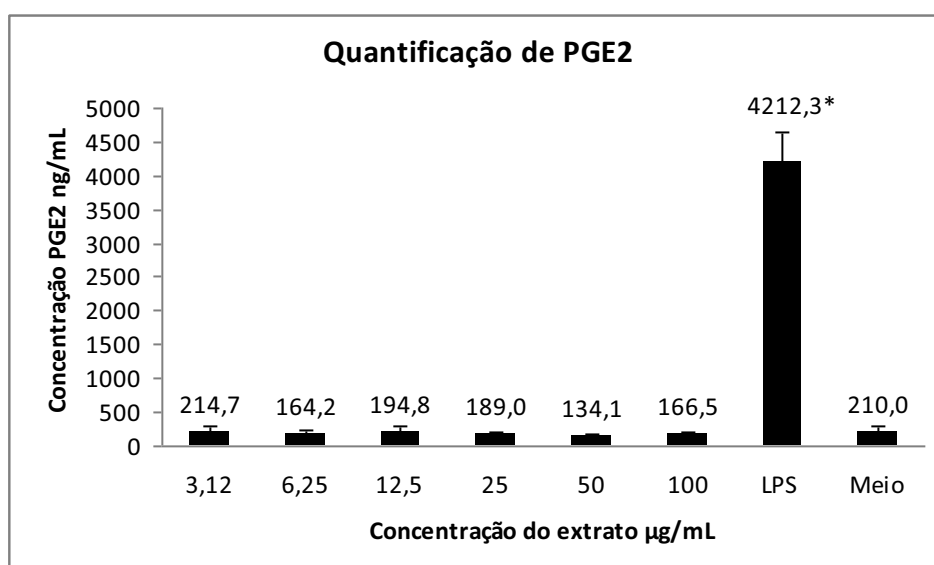


Figura 10: Produção de PGE2 em cultura de macrófagos RAW.264, na presença de cinco concentrações do extrato de semente de *C. pallida*, de 3 experimentos independentes, realizados em quadruplicata. (Controle negativo: Meio DMEM; Controle positivo: lipopolissacarídeo de *E. coli*- LPS - 1µg/mL). * $p < 0,05$ vs meio (controle negativo) (ANOVA seguido de Bonferroni).

4.6.3.2. Quantificação de PGE2 com fração alcaloídica de semente de *C. pallida*

Os resultados da quantificação de PGE2 para a fração alcaloídica de semente mostraram que nenhuma das concentrações testadas da amostra foi capaz de estimular significativamente a produção de PGE2, como disposto na Figura 11.

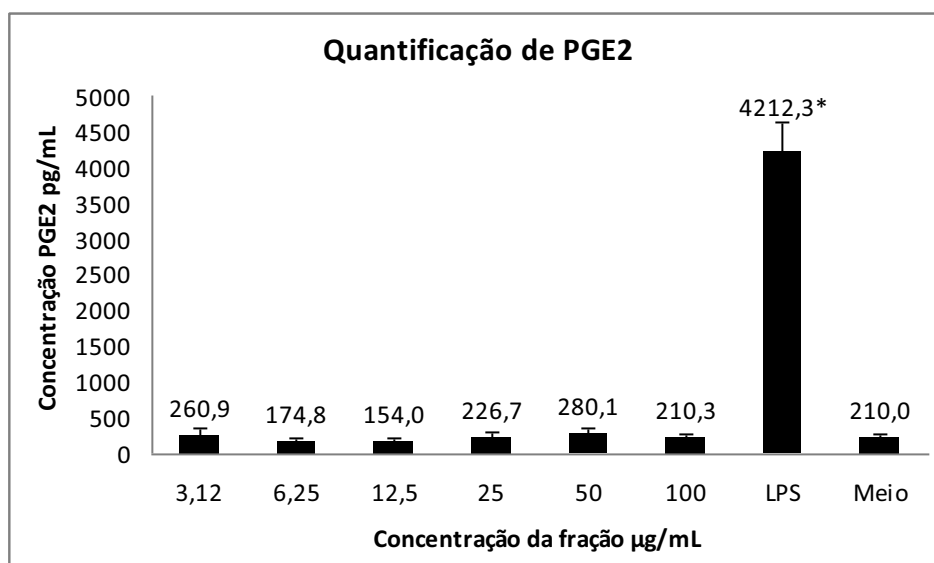


Figura 11: Produção de PGE2 em cultura de macrófagos RAW.264, na presença de cinco concentrações da fração alcaloídica de semente de *C. pallida*, de 3 experimentos independentes, realizados em quadruplicata. Controle negativo: Meio DMEM; Controle positivo: lipopolissacarídeo de *E. coli*- LPS - 1µg/mL). * $p < 0,05$ vs meio (controle negativo) (ANOVA seguido de Bonferroni).

4.7. Ensaio de estrogenicidade (RYA)

4.7.1. Viabilidade das leveduras *S. cerevisiae*

O ensaio de viabilidade foi realizado a partir do cálculo das unidades formadoras de colônias (UFC). As UFCs obtidas nos diferentes tratamentos foram comparadas com as UFCs do controle negativo (DMSO). Nenhuma das amostras testadas demonstrou citotoxicidade para a levedura.

4.7.2. Equivantes em estradiol (EEQ) e valores de EC 50 dos extratos de *M. hirtum* e *C. pallida*

Os resultados da avaliação da atividade estrogênica (EEQ geral) através do teste RYA foram dispostos em tabelas. Foram avaliadas 20 amostras, sendo 2 delas compostas de extratos de *M. hirtum* (folhas; caule), 4 de extratos de *C. pallida* (flores; folhas; semente; pericarpo), 3 frações enriquecidas obtidas de flores de *C. pallida*, 3 frações enriquecidas provenientes do extrato de folhas de *C. pallida*, 4 frações de semente e outras 3 frações provenientes do extrato de pericarpo da mesma planta. Além disso, foi também avaliada a atividade estrogênica do estigmasterol, substância isolada da fração diclorometânica de folhas de *C. pallida*.

A Tabela 11 mostra os resultados de EEQ geral (média \pm desvio padrão de 3 experimentos independentes) e os valores de EC50 obtidos para os extratos de *M. hirtum* e extratos de *C. pallida*.

Os extratos de *M. hirtum* apresentaram baixos valores de EEQ geral, sendo de 0,50 nM para o extrato de folhas e 0,08 nM para o extrato de caule, além de altos valores de EC50, mostrando o baixo potencial estrogênico destas amostras.

Por outro lado, todos os extratos de *C. pallida* forneceram valores importantes de equivalentes em estradiol e de EC50. O ensaio de RYA com o extrato de flores de *C. pallida* forneceu como EEQ geral 6,0 nM. Isso significa que a amostra tem uma atividade estrogênica equivalente a uma concentração de 6,0 nM de estradiol. O valor

de EC50 para esta amostra foi de 0,5 g/mL. O extrato obtido das folhas apresentou maior resultado de EEQ geral (14,3 nM), demonstrando ser o extrato com maior atividade estrogênica, o que também pode ser afirmado pelo valor de EC50 que foi de 0,2 g/mL. Já os extratos de semente e de pericarpo de *C. pallida*, apresentaram, respectivamente, valores de EEQ geral de 10,7 nM e 8,31 nM. O valor de EC50 obtido pela amostra de extrato de semente de *C. pallida* foi 0,8 g/mL enquanto para o extrato de pericarpo este valor foi de 0,5 g/mL.

Tabela 11: Atividade estrogênica expressa através dos valores de equivalentes de estradiol (EEQ) \pm desvio padrão dos extratos e valores de EC50 de *M. hirtum* (folhas e caule) e *C. pallida* (flores, folhas, semente e pericarpo), utilizando a linhagem geneticamente modificada BY4741 de *S. cerevisiae*.

Extratos	EEQ (nM) média\pmDP	EC50 (g/mL)
<i>M. hirtum</i> – folhas	0,50 \pm 0,03	52,7
<i>M. hirtum</i> – caule	0,08 \pm 0,01	54,0
<i>C. pallida</i> – flores	6,0 \pm 2,6	0,5
<i>C. pallida</i> – folhas	14,3 \pm 4,1	0,2
<i>C. pallida</i> – semente	10,7 \pm 5,0	0,8
<i>C. pallida</i> – pericarpo	8,3 \pm 2,3	0,5

4.7.3. Equivalentes em estradiol (EEQ) e valores de EC50 das frações enriquecidas de *C. pallida*

Como os extratos provenientes de *C. pallida* demonstraram potencial estrogênico quando analisados pelo ensaio RYA, decidiu-se continuar a análise de estrogenicidade com as frações enriquecidas obtidas a partir das diferentes partes da planta, com a finalidade de se identificar em qual fração a estrogenicidade permanecia evidente, e por fim, encontrar a principal substância responsável por esta atividade.

A tabela 12 apresenta os resultados do ensaio de estrogenicidade em EEQ geral (média \pm desvio padrão de 3 experimentos independentes) e valores de EC50 das frações enriquecidas (diclorometânica, clorofórmica e butanólica) provenientes das diversas partes das plantas.

As frações diclorometânica, clorofórmica e butanólica provenientes de flores de *C. pallida* apresentaram como valores de EEQ geral: 19,9 nM, 0,3 nM e 2,42 nM, respectivamente. Dentre estas amostras, a que mostrou maior potencial estrogênico foi a fração diclorometânica, já que obteve um valor de EC50 de 0,2 g/mL, enquanto a fração clorofórmica e butanólica forneceram valores de 11,1 g/mL e 11,8 g/mL respectivamente. As frações diclorometânica e clorofórmica de folhas de *C. pallida* demonstraram maiores valores de EEQ geral (89,0 nM e 21,0 nM, respectivamente), e EC50 de 0,1 g/mL e 0,5 g/mL, respectivamente, como apresentado na tabela 10. Já para a fração butanólica da mesma parte da planta, obteve-se um valor de EEQ geral de 0,3 nM e um EC50 de 5,6 g/mL.

Para as frações diclorometânica e butanólica de semente de *C. pallida*, os valores de EEQ geral foram de 1,9 nM e 2,2 nM, respectivamente, enquanto para a fração clorofórmica não foi observado nenhum valor de EEQ geral. Os valores de EC50 para estas frações foram de 2,7 g/mL para a diclorometânica e 10,9 g/mL para a butanólica. Enquanto para a fração alcaloídica de semente foi observado além de um alto valor de EEQ geral, em relação às amostras testadas (13,9 nM), um valor importante de EC50 (0,004 g/mL). Já para as frações diclorometânica e clorofórmica de pericarpo, o ensaio RYA forneceu valores de EEQ geral de 9,3 nM e 15,6 nM,

respectivamente. Dentre as amostras de pericarpo, a que apresentou menor EC50 foi a clorofórmica (0,4 g/mL) enquanto a fração diclorometânica mostrou EC50 de 1,0 g/mL.

Tabela 12: Atividade estrogênica expressa através dos valores de equivalentes de estradiol (EEQ) \pm desvio padrão e valores de EC50 das frações enriquecidas provenientes de flores, folhas, semente e pericarpo de *C. pallida* utilizando a linhagem geneticamente modificada BY4741 de *S. cerevisiae*.

	Frações	EEQ (nM) média\pmDP	EC50 (g/mL)
Flores	Diclorometânica	19,9 \pm 4,7	0,2
	Clorofórmica	0,3 \pm 0,05	11,1
	Butanólica	2,4 \pm 0,2	11,8
Folhas	Diclorometânica	89,0 \pm 16,0	0,1
	Clorofórmica	21,0 \pm 1,4	0,5
	Butanólica	0,3 \pm 0,1	5,6
Semente	Diclorometânica	1,9 \pm 0,03	2,7
	Clorofórmica	0,0	-
	Butanólica	2,2 \pm 0,1	10,9
	Alcaloídica	13,9 \pm 1,3	0,004
Pericarpo	Diclorometânica	9,3 \pm 1,8	1,0
	Clorofórmica	15,6 \pm 2,5	0,4
	Butanólica	0,0	-

4.7.4. Equivalentes em estradiol (EEQ) do estigmasterol isolado da fração diclorometânica de *C. pallida*

O estigmasterol, isolado da fração diclorometânica de folhas de *C. pallida* também foi avaliado quanto ao seu potencial estrogênico, pelo teste de RYA. Esta substância apresentou resultados positivos de estrogenicidade, visto que obteve um valor de equivalente em estradiol de 122,0 nM e além disso, um valor de EC50 igual a $10,5 \times 10^{-7}$ g/mL.

4.7.5. Análise da atividade estrogênica por meio da avaliação da atividade da β -galactosidade, expressa em unidades de fluorescência, dos extratos de *M. hirtum* e *C. pallida*

Além dos valores de EEQ geral fornecido pelo ensaio de estrogenicidade, uma outra maneira de analisar a atividade estrogênica das amostras é por meio da avaliação da atividade da enzima β -galactosidase (expressa em unidades de fluorescências), a qual só é expressa quando há na amostra, constituintes capazes de se ligar aos receptores estrogênicos presentes na levedura modificada.

Na Figura 12, pode-se verificar a atividade estrogênica, expressa em unidades de fluorescência, do extrato de folhas de *M. hirtum*, sendo as médias de fluorescências comparadas com as do controle negativo (DMSO a 10%). Nenhuma das concentrações testadas para este extrato foi capaz de gerar ativação significativa da enzima β -galactosidase, quando comparadas com o controle negativo. O comportamento da amostra durante os 20 minutos de leitura foi disposto na Figura 13, sendo possível verificar que não houve aumento significativo das unidades de fluorescências no decorrer do tempo. O mesmo se repete com o extrato de caule de *M. hirtum*, em que as diferentes concentrações apresentaram resultados semelhantes ao desempenhado pelo controle negativo (Figura 14). A cinética da reação está disposta na Figura 15.

Em relação ao extrato de flores de *C. pallida*, principalmente na maior concentração testada, 4,6 $\mu\text{g/poço}$, é possível verificar uma maior atividade enzimática quando comparada ao controle negativo, como disposto na Figura 16. A cinética desta reação pode ser vista na Figura 17, onde nota-se um aumento das unidades de fluorescência durante o tempo.

A Figura 18 mostra a atividade estrogênica, expressa em unidades de fluorescências, das diferentes concentrações testadas do extrato de folhas de *C. pallida*. Nota-se que diferentes concentrações testadas foram capazes de fornecer ativação enzimática significativa, principalmente a correspondente a 2,3 $\mu\text{g/poço}$. Na Figura 19, o comportamento da amostra em função do tempo é apresentado.

O extrato de semente de *C. pallida* também foi capaz de gerar altas unidades de fluorescências (figura 20), principalmente na maior concentração analisada para este extrato, 100,0 µg/poço. A Figura 21 traz informações a respeito da cinética desta reação.

A amostra de extrato de pericarpo de *C. pallida*, assim como os demais extratos provenientes desta planta, foi capaz de fornecer resultados significativos de estrogenicidade. A concentração de 71,0 µg/poço foi a concentração capaz de gerar maior ativação enzimática, como observado na Figura 22. A cinética desse extrato é demonstrada na Figura 23.

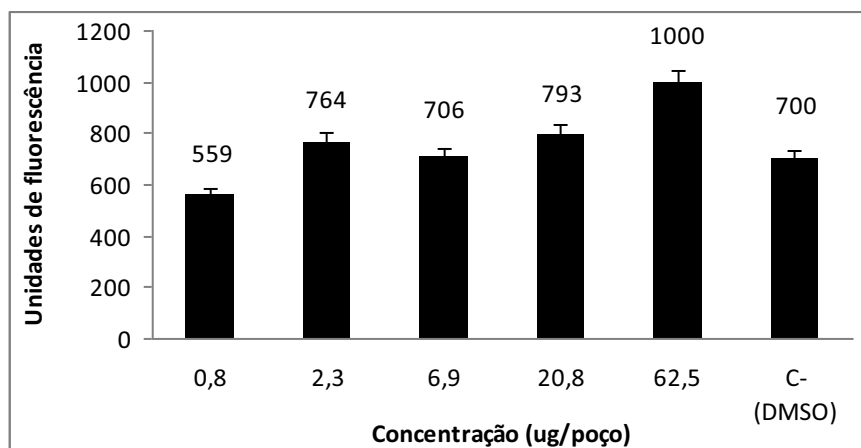


Figura 12: Atividade estrogênica, expressa em unidades de fluorescência, das diferentes concentrações testadas do extrato de folhas de *M. hirtum*, utilizando a linhagem geneticamente modificada BY4741 de *S. cerevisiae*, sendo as médias das unidades de fluorescência do extrato comparadas com as do controle negativo (DMSO a 10%).

Fluorescência do C+ (17- β -estradiol): 13263 ± 537

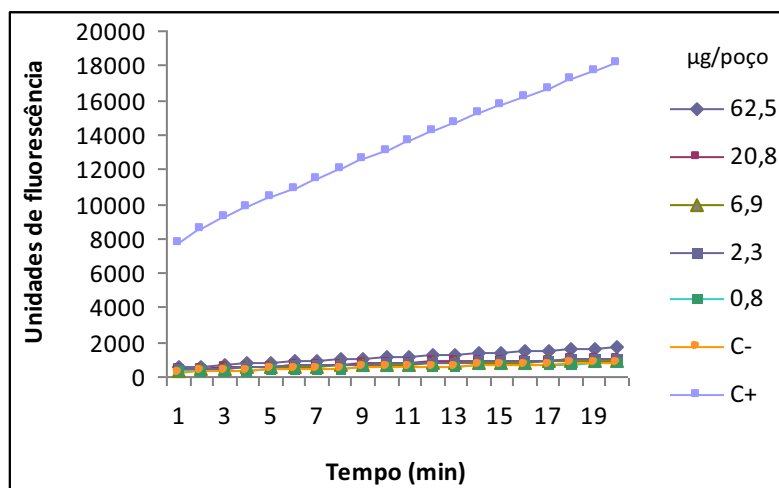


Figura 13: Cinética do extrato de folhas de *M. hirtum*, mostrando as unidades de fluorescência em função do tempo das cinco concentrações ($\mu\text{g/poço}$) testadas dos controles negativo (DMSO a 10%) e positivo (10 nM de estradiol).

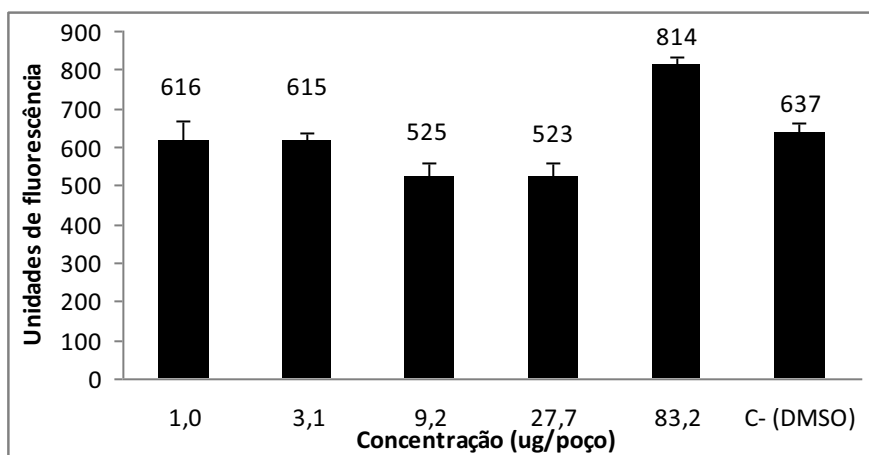


Figura 14: Atividade estrogênica, expressa em unidades de fluorescência, das diferentes concentrações testadas do extrato de caule de *M. hirtum*, utilizando a linhagem geneticamente modificada BY4741 de *S. cerevisiae*, sendo as médias das unidades de fluorescência do extrato comparadas com as do controle negativo (DMSO a 10%).

Fluorescência do C+ (17-β estradiol): 15140 ± 342

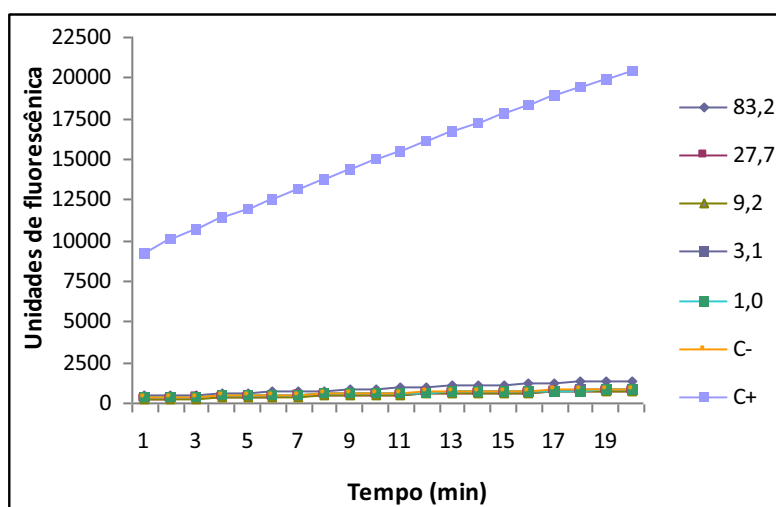


Figura 15: Cinética do extrato de caule de *M. hirtum*, mostrando as unidades de fluorescência em função do tempo das cinco concentrações (µg/poço) e dos controles negativo (DMSO a 10%) e positivo (10 nM de estradiol).

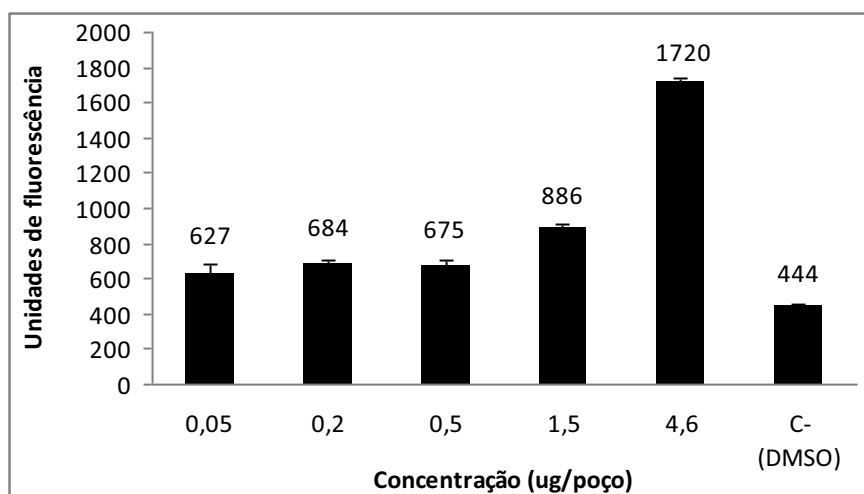


Figura 16: Atividade estrogênica, expressa em unidades de fluorescência, das diferentes concentrações testadas do extrato de flores de *C. pallida*, utilizando a linhagem geneticamente modificada BY4741 de *S. cerevisiae*, sendo as médias das unidades de fluorescência do extrato comparadas com as do controle negativo (DMSO a 10%).

Fluorescência do C+ (17- β -estradiol): 11569 ± 985

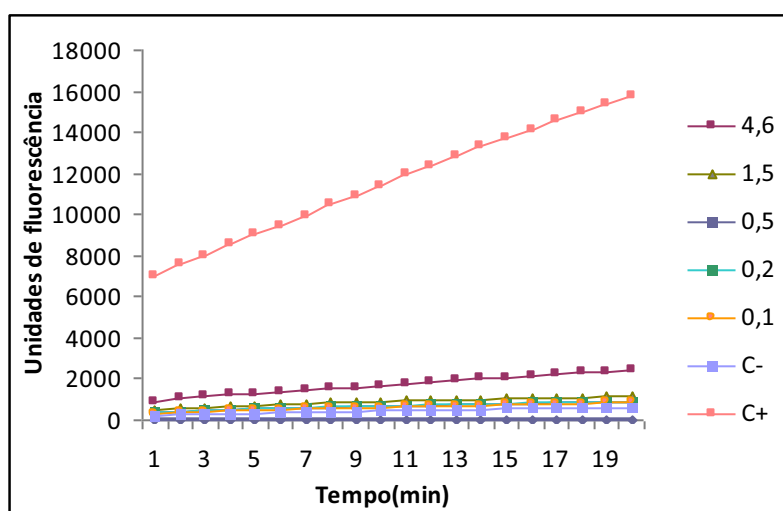


Figura 17: Cinética do extrato de flores de *C. pallida*, mostrando as unidades de fluorescências em função do tempo das cinco concentrações ($\mu\text{g/poço}$) e dos controles negativo (DMSO a 10%) e positivo (10 nM de estradiol).

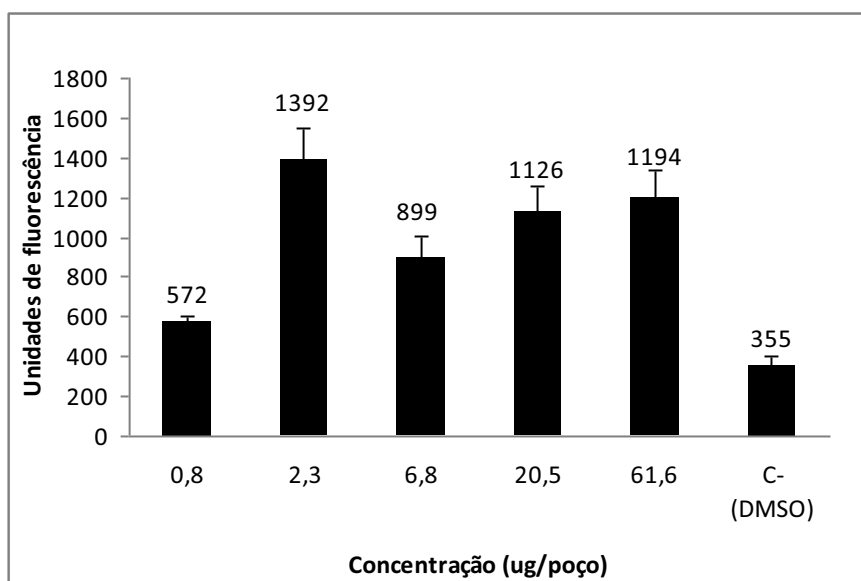


Figura 18: Atividade estrogênica, expressa em unidades de fluorescência, das diferentes concentrações testadas do extrato de folhas de *C. pallida*, utilizando a linhagem geneticamente modificada BY4741 de *S. cerevisiae*, sendo as médias das unidades de fluorescência do extrato comparadas com as do controle negativo (DMSO a 10%).

Fluorescência do C+ (17- β -estradiol): 9834 ± 985

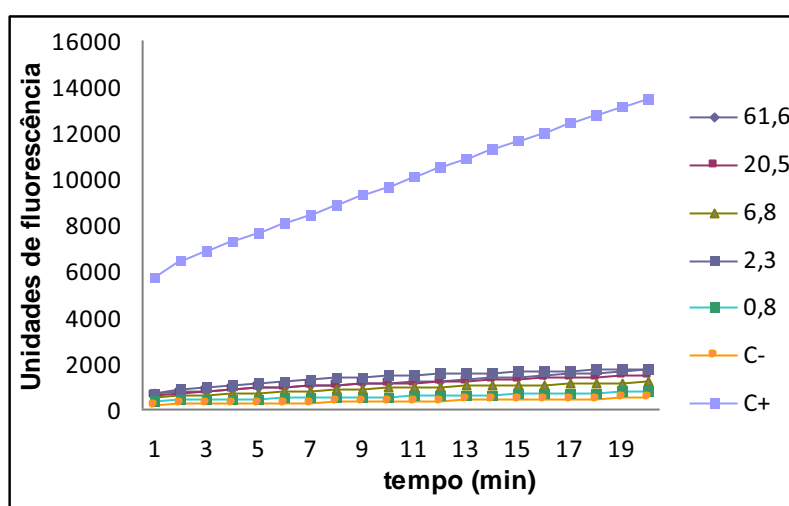


Figura 19: Cinética do extrato de folhas de *C. pallida*, mostrando as unidades de fluorescência em função do tempo das cinco concentrações ($\mu\text{g/poço}$) e dos controles negativo (DMSO a 10%) e positivo (10 nM de estradiol).

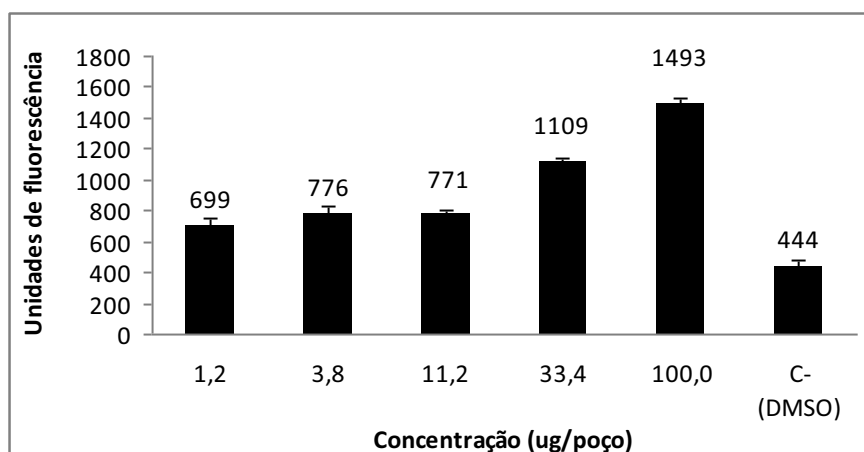


Figura 20: Atividade estrogênica, expressa em unidades de fluorescência, das diferentes concentrações testadas do extrato de semente de *C. pallida*, utilizando a linhagem geneticamente modificada BY4741 de *S. cerevisiae*, sendo as médias das unidades de fluorescência do extrato comparadas com as do controle negativo (DMSO a 10%).

Fluorescência do C+ (17- β -estradiol): 11569 ± 1280

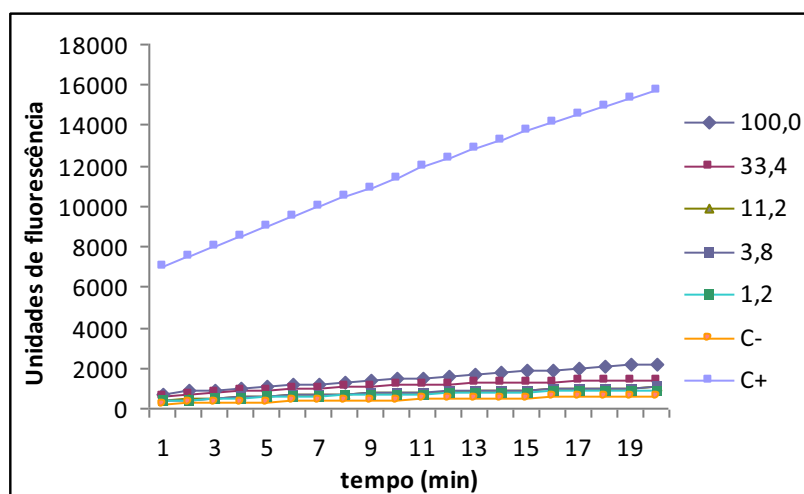


Figura 21: Cinética do extrato de semente de *C. pallida*, mostrando as unidades de fluorescência em função do tempo das cinco concentrações ($\mu\text{g/poço}$) e dos controles negativo (DMSO a 10%) e positivo (10 nM de estradiol).

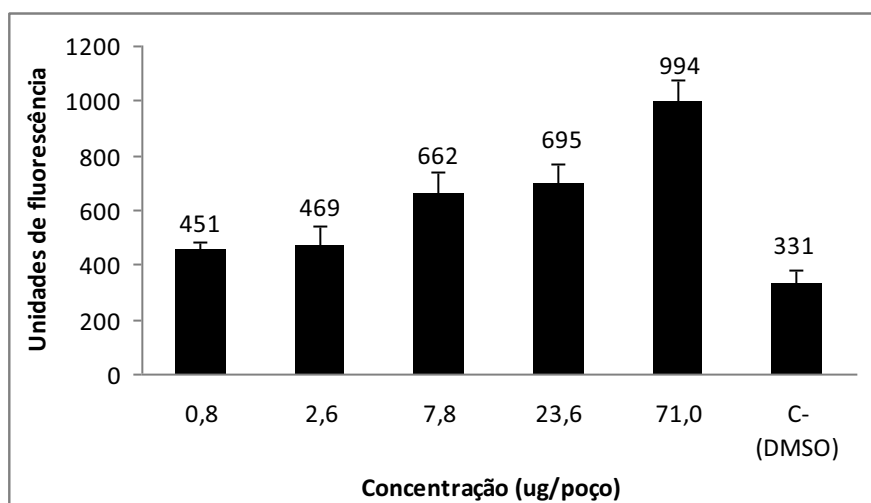


Figura 22: Atividade estrogênica, expressa em unidades de fluorescência, das diferentes concentrações testadas do extrato de pericarpo de *C. pallida*, utilizando a linhagem geneticamente modificada BY4741 de *S. cerevisiae*, sendo as médias das unidades de fluorescência do extrato comparadas com as do controle negativo (DMSO a 10%).

Fluorescência do C+ (17- β -estradiol): 9246 ± 965

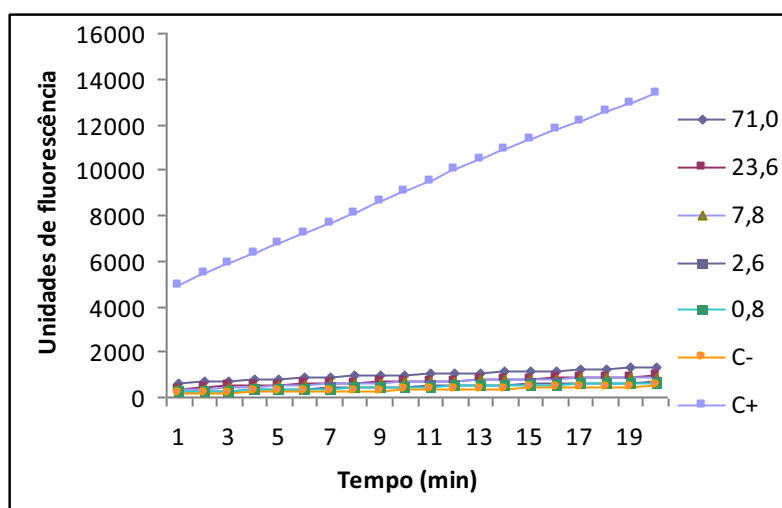


Figura 23: Cinética do extrato de pericarpo de *C. pallida*, mostrando as unidades de fluorescência em função do tempo das cinco concentrações ($\mu\text{g/poço}$) e dos controles negativo (DMSO a 10%) e positivo (10 nM de estradiol).

4.7.6. Análise da atividade estrogênica por meio da avaliação da atividade da β -galactosidase, expressa em unidades de fluorescência, das frações enriquecidas provenientes de *C. pallida*

A Figura 24 apresenta a atividade estrogênica, expressa em unidades de fluorescência, da fração diclorometânica de flores de *C. pallida*, sendo as médias de fluorescências comparadas com as do controle negativo (DMSO a 10%). Esta fração foi capaz de gerar ativação da enzima β -galactosidase, principalmente na concentração de 6,4 $\mu\text{g/poço}$. O comportamento da amostra durante os 20 minutos de leitura foi disposto na Figura 25, sendo possível verificar que houve aumento significativo das unidades de fluorescências no decorrer do tempo, tendo as fluorescências da amostra comportamento similar ao obtido pelo controle positivo. A fração clorofórmica da mesma parte da planta também se mostrou estrogênica, já que foi capaz de gerar maior ativação enzimática, quando comparada ao controle negativo (Figura 26), sendo essa ativação mais evidente na maior concentração testada (53,0 $\mu\text{g/poço}$). A cinética da reação está disposta na Figura 27. Em relação à fração butanólica de flores de *C. pallida*, não foram observados aumentos significativos das unidades de fluorescência nas concentrações analisadas, como apresentado na figura 28. A cinética da reação está apresentada na Figura 29, onde não se observa um aumento das unidades de fluorescências com o tempo.

A fração diclorometânica de folhas de *C. pallida* apresentou uma atividade estrogênica importante. Na Figura 30, nota-se que as concentrações testadas foram capazes de apresentar uma evidente ativação enzimática quando comparada ao controle negativo, mesmo nas menores concentrações testadas. A concentração de 18,9 $\mu\text{g/poço}$ foi a capaz de gerar maior ativação enzimática. Na Figura 31, é possível observar que o comportamento das concentrações em função do tempo se assemelha ao desempenhado pelo controle positivo. A Figura 32 mostra a atividade da β -galactosidase, expressa em unidades de fluorescências, da fração clorofórmica da mesma parte da planta. A concentração de 19,4 $\mu\text{g/poço}$ forneceu os maiores valores de fluorescências, dentre as analisadas. A cinética da reação é apresentada na Figura 33. Já a fração butanólica de folhas de *C. pallida*, não apresentou significativa ativação enzimática, em nenhuma das

concentrações testadas, quando comparadas com o controle negativo (Figura 34). Na Figura 35, não se observa aumento das fluorescências durante a leitura de 20 minutos.

Para as frações enriquecidas provenientes de semente de *C. pallida*, tanto as frações diclorometânica, quanto clorofórmica e butanólica, não foram capazes de gerar aumentos nas unidades de fluorescências quando comparado ao controle negativo, como disposto nas Figuras de 36 à 41. Já a fração alcaloídica foi capaz de gerar uma significativa ativação da enzima β -galactosidase, expressa em unidades de fluorescência, sendo a maior atividade observada na concentração de 0,4 $\mu\text{g/poço}$. O comportamento da amostra durante a leitura cinética é apresentado na Figura 43.

As frações enriquecidas obtidas de pericarpo de *C. pallida* também tiveram sua atividade estrogênica determinada, usando como parâmetro a ativação de β -galactosidase. A Figura 44 traz informações a respeito das unidades de fluorescências obtidas para as concentrações testadas da fração diclorometânica de pericarpo. Nota-se que apenas na última concentração (165,0 $\mu\text{g/poço}$) é observada uma maior atividade enzimática, podendo a cinética desta reação ser visualizada na Figura 45. A Figura 46 traz informações a respeito da atividade estrogênica da fração clorofórmica de pericarpo, sendo na última concentração (36,0 $\mu\text{g/poço}$) observado as maiores unidades de fluorescências. Em relação à fração butanólica desta parte da planta, as unidades de fluorescências obtidas pelas diferentes concentrações testadas da amostra foram semelhantes às obtidas pelo controle negativo (Figura 48). O comportamento da amostra em função do tempo encontra-se disposto na Figura 49.

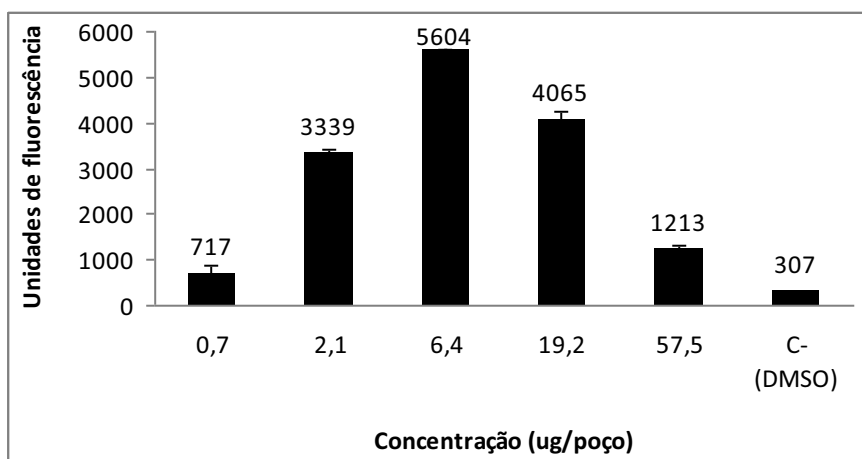


Figura 24: Atividade estrogênica, expressa em unidades de fluorescência, das diferentes concentrações testadas da fração diclorometânica de flores de *C. pallida*, utilizando a linhagem geneticamente modificada BY4741 de *S. cerevisiae*, sendo as médias das unidades de fluorescência do extrato comparadas com as do controle negativo (DMSO a 10%).

Fluorescência do C+ (17- β -estradiol): 8410 ± 375

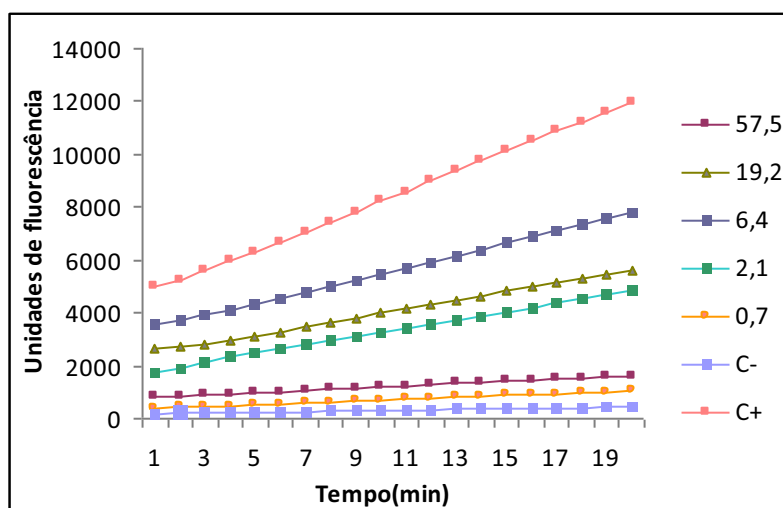


Figura 25: Cinética fração diclorometânica de flores de *C. pallida*, mostrando as unidades de fluorescência em função do tempo das cinco concentrações ($\mu\text{g/poço}$) e dos controles negativo (DMSO a 10%) e positivo (10 nM de estradiol).

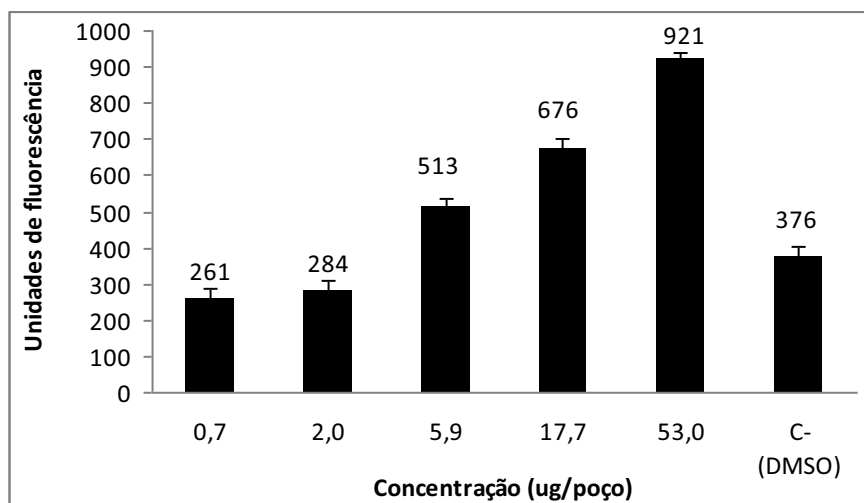


Figura 26: Atividade estrogênica, expressa em unidades de fluorescência, das diferentes concentrações testadas da fração clorofórmica de flores de *C. pallida*, utilizando a linhagem geneticamente modificada BY4741 de *S. cerevisiae*, sendo as médias das unidades de fluorescência do extrato comparadas com as do controle negativo (DMSO a 10%).

Fluorescência do C+ (17- β -estradiol): 6162 ± 578

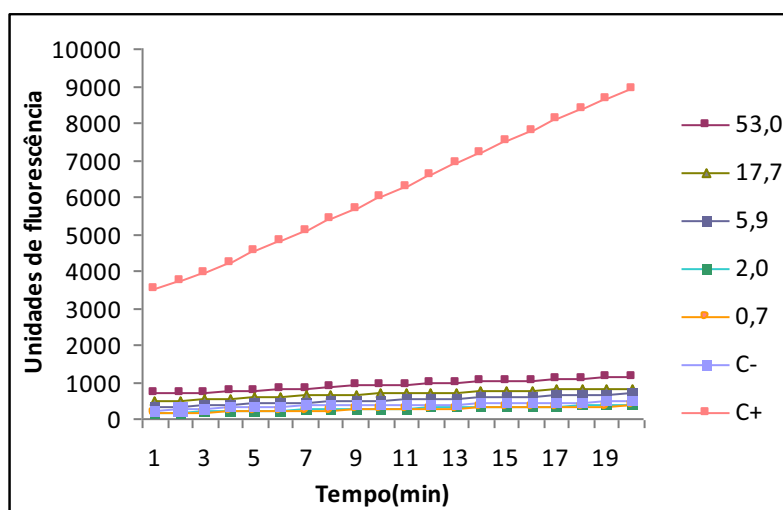


Figura 27: Cinética fração clorofórmica de flores de *C. pallida*, mostrando as unidades de fluorescência em função do tempo das cinco concentrações ($\mu\text{g/poço}$) e dos controles negativo (DMSO a 10%) e positivo (10 nM de estradiol).

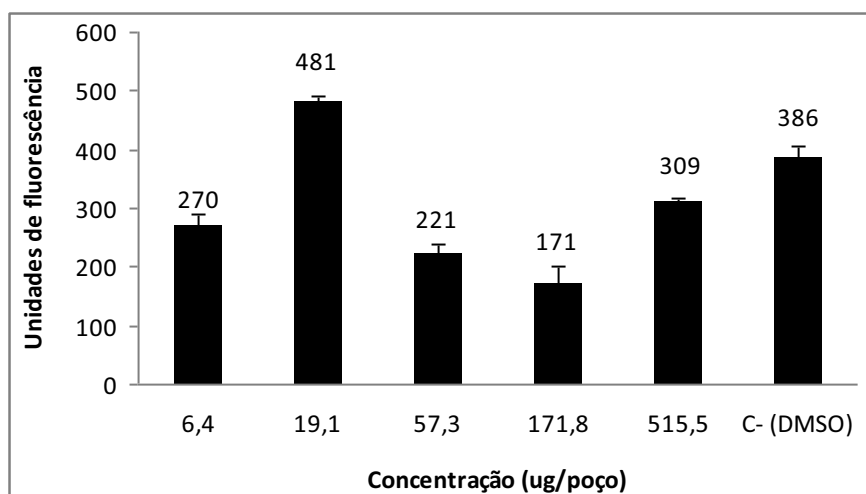


Figura 28: Atividade estrogênica, expressa em unidades de fluorescência, das diferentes concentrações testadas da fração butanólica de flores de *C. pallida*, utilizando a linhagem geneticamente modificada BY4741 de *S. cerevisiae*, sendo as médias das unidades de fluorescência do extrato comparadas com as do controle negativo (DMSO a 10%).

Fluorescência do C+ (17- β -estradiol): 6985 ± 665

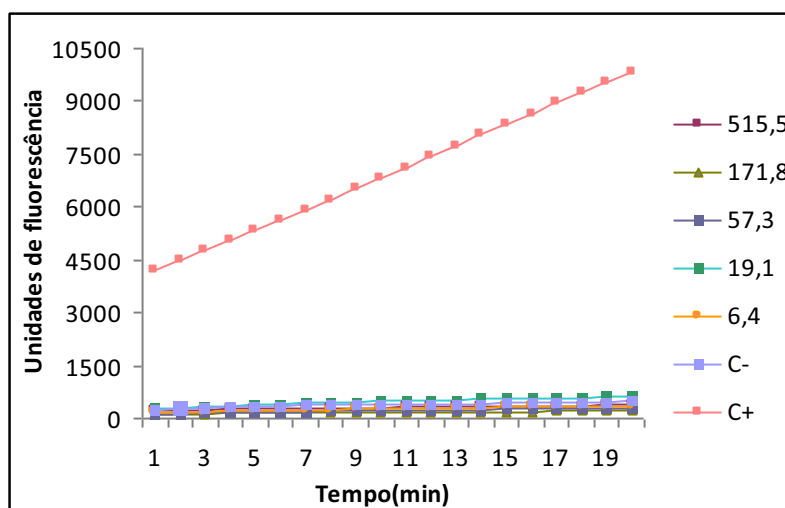


Figura 29: Cinética fração butanólica de flores de *C. pallida*, mostrando as unidades de fluorescência em função do tempo das cinco concentrações ($\mu\text{g/poço}$) e dos controles negativo (DMSO a 10%) e positivo (10 nM de estradiol).

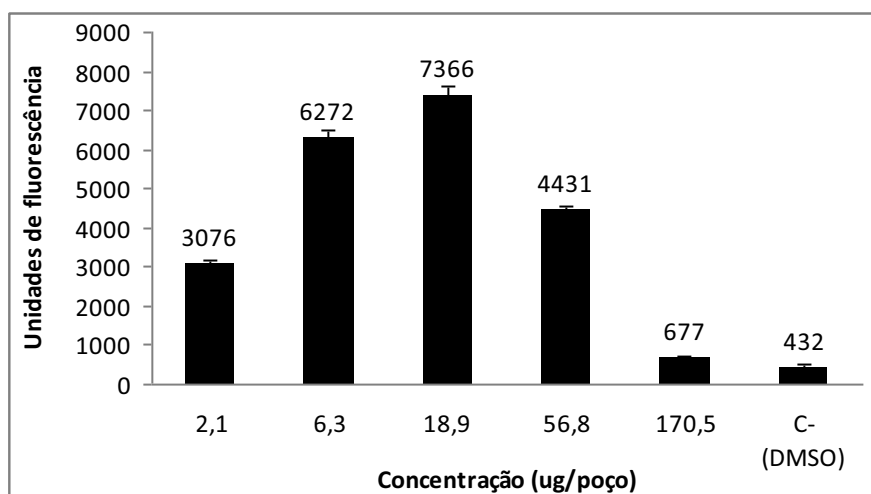


Figura 30: Atividade estrogênica, expressa em unidades de fluorescência, das diferentes concentrações testadas da fração diclorometânica de folhas de *C. pallida*, utilizando a linhagem geneticamente modificada BY4741 de *S. cerevisiae*, sendo as médias das unidades de fluorescência do extrato comparadas com as do controle negativo (DMSO a 10%).

Fluorescência do C+ (17- β -estradiol): 11490 ± 496

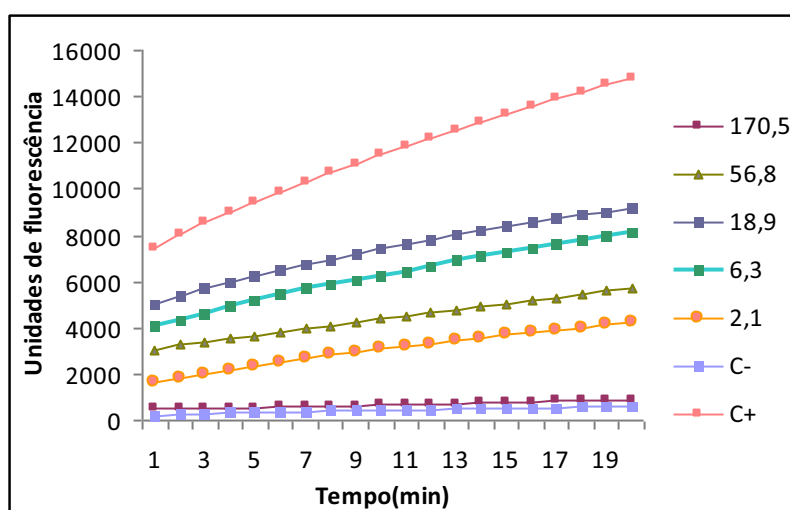


Figura 31: Cinética fração diclorometânica de folhas de *C. pallida*, mostrando as unidades de fluorescência em função do tempo das cinco concentrações ($\mu\text{g/poço}$) e dos controles negativo (DMSO a 10%) e positivo (10 nM de estradiol).

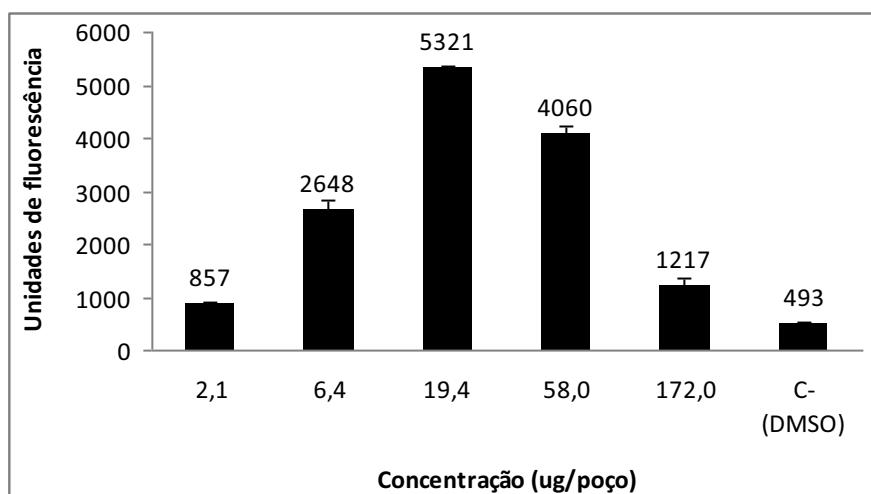


Figura 32: Atividade estrogênica, expressa em unidades de fluorescência, das diferentes concentrações testadas da fração clorofórmica de folhas de *C. pallida*, utilizando a linhagem geneticamente modificada BY4741 de *S. cerevisiae*, sendo as médias das unidades de fluorescência do extrato comparadas com as do controle negativo (DMSO a 10%).

Fluorescência do C+ (17-β-estradiol): 11966 ± 492

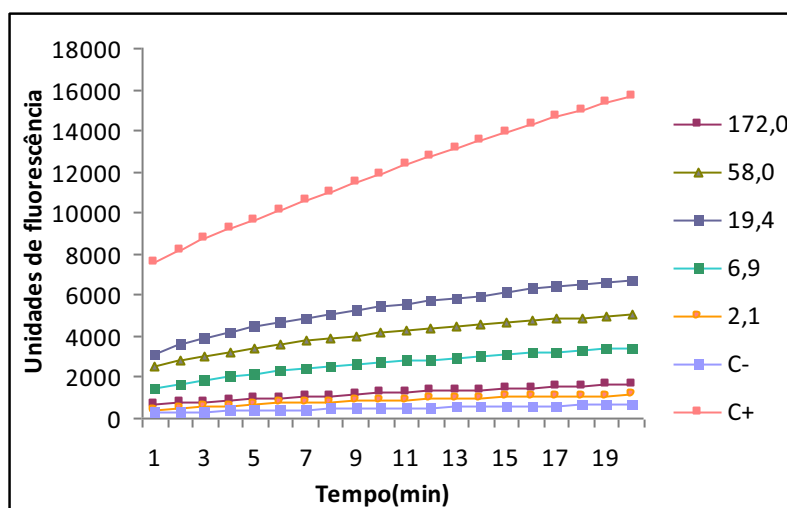


Figura 33: Cinética fração clorofórmica de folhas de *C. pallida*, mostrando as unidades de fluorescência em função do tempo das cinco concentrações (µg/poço) e dos controles negativo (DMSO a 10%) e positivo (10 nM de estradiol).

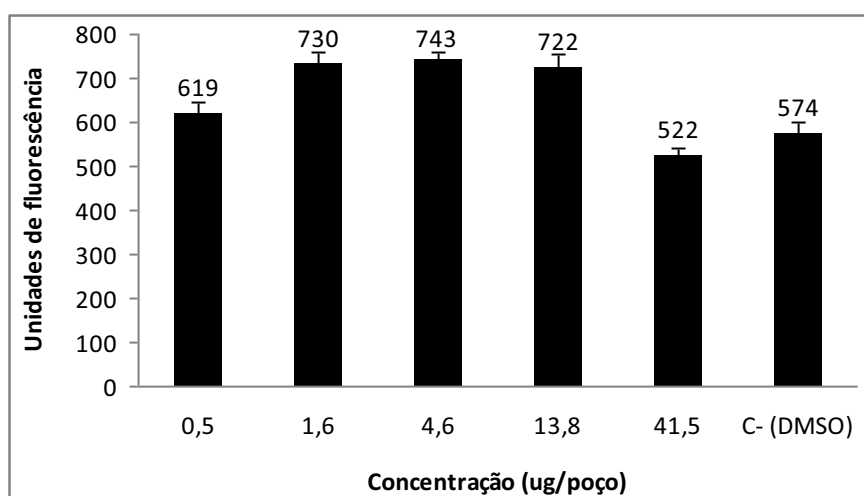


Figura 34: Atividade estrogênica, expressa em unidades de fluorescência, das diferentes concentrações testadas da fração butanólica de folhas de *C. pallida*, utilizando a linhagem geneticamente modificada BY4741 de *S. cerevisiae*, sendo as médias das unidades de fluorescência do extrato comparadas com as do controle negativo (DMSO a 10%).

Fluorescência do C+ (17- β -estradiol): 12512 \pm 302

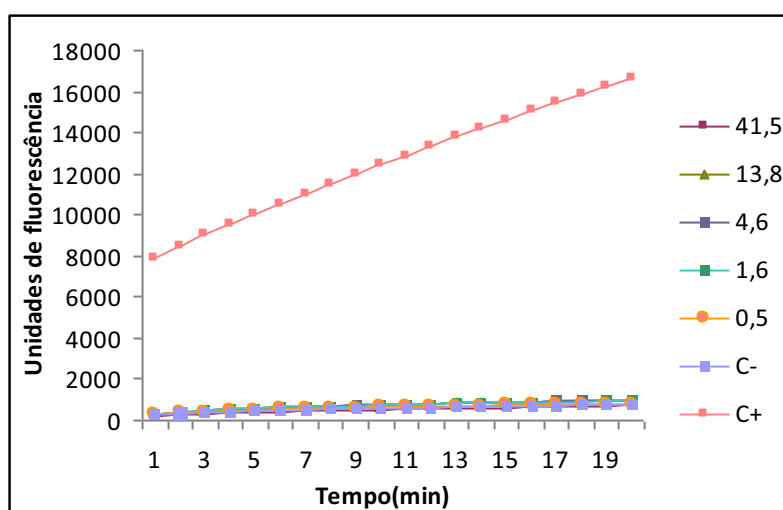


Figura 35: Cinética fração butanólica de folhas de *C. pallida*, mostrando as unidades de fluorescência em função do tempo das cinco concentrações ($\mu\text{g/poço}$) e dos controles negativo (DMSO a 10%) e positivo (10 nM de estradiol).

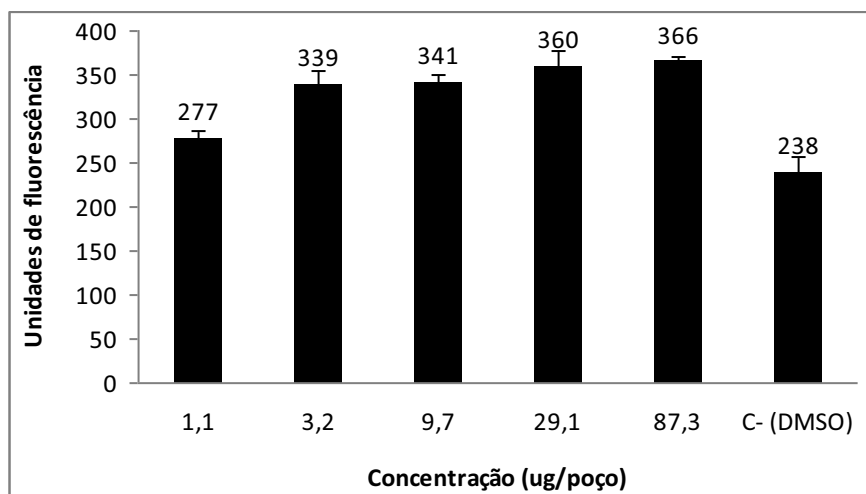


Figura 36: Atividade estrogênica, expressa em unidades de fluorescência, das diferentes concentrações testadas da fração diclorometânica de semente de *C. pallida*, utilizando a linhagem geneticamente modificada BY4741 de *S. cerevisiae*, sendo as médias das unidades de fluorescência do extrato comparadas com as do controle negativo (DMSO a 10%).

Fluorescência do C+ (17- β -estradiol): 9099 ± 54

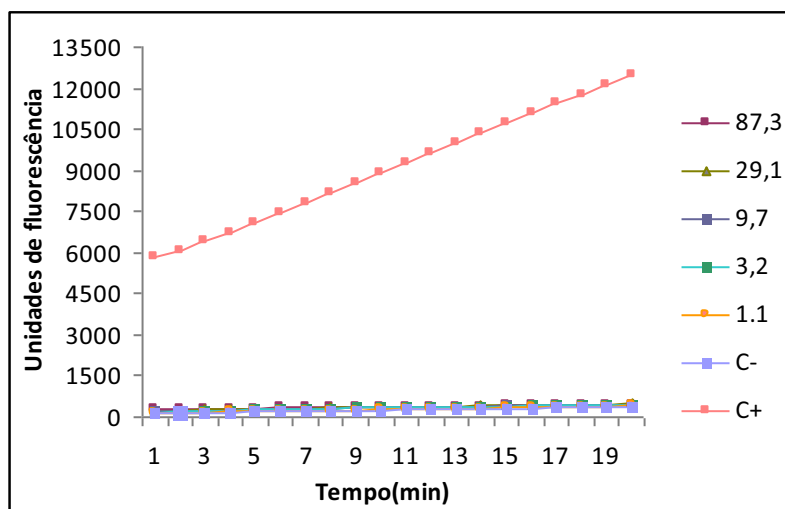


Figura 37: Cinética fração diclorometânica de semente de *C. pallida*, mostrando as unidades de fluorescência em função do tempo das cinco concentrações ($\mu\text{g/poço}$) e dos controles negativo (DMSO a 10%) e positivo (10 nM de estradiol).

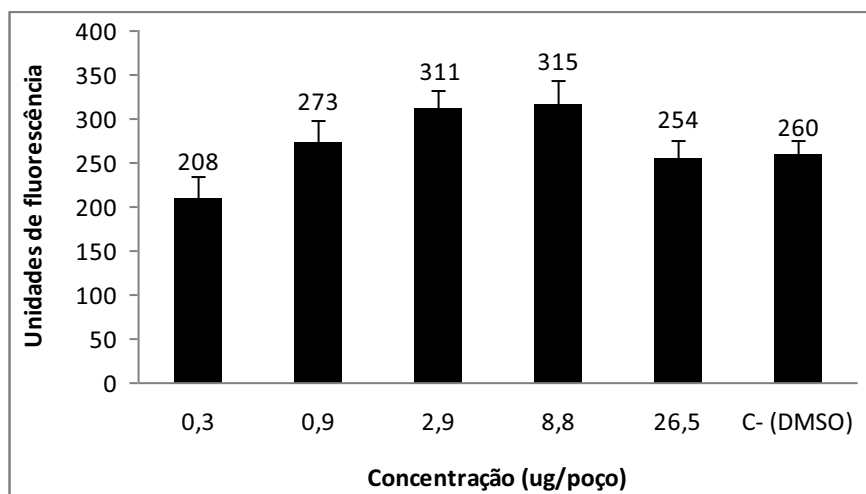


Figura 38: Atividade estrogênica, expressa em unidades de fluorescência, das diferentes concentrações testadas da fração clorofórmica de semente de *C. pallida*, utilizando a linhagem geneticamente modificada BY4741 de *S. cerevisiae*, sendo as médias das unidades de fluorescência do extrato comparadas com as do controle negativo (DMSO a 10%).

Fluorescência do C+ (17- β -estradiol): 8159 ± 386

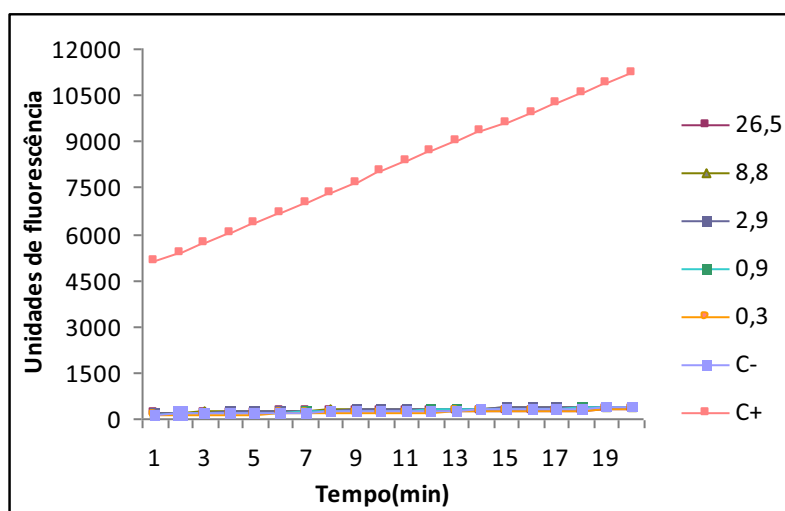


Figura 39: Cinética fração clorofórmica de semente de *C. pallida*, mostrando as unidades de fluorescência em função do tempo das cinco concentrações ($\mu\text{g/poço}$) e dos controles negativo (DMSO a 10%) e positivo (10 nM de estradiol).

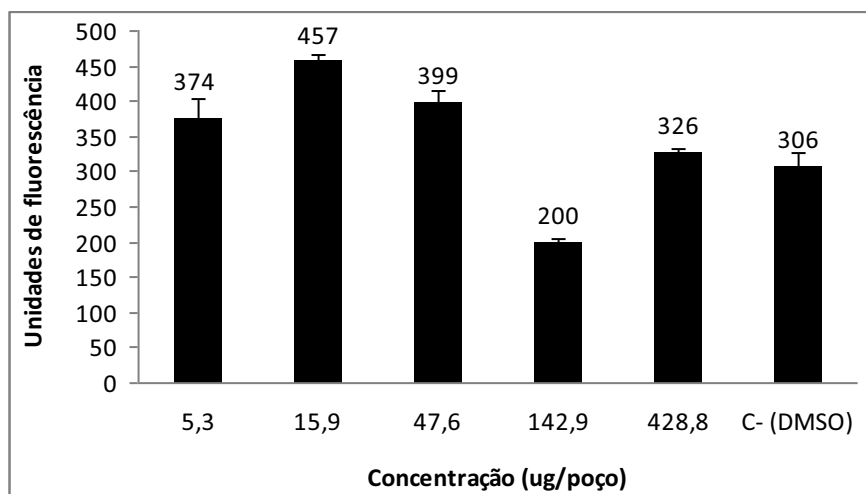


Figura 40: Atividade estrogênica, expressa em unidades de fluorescência, das diferentes concentrações testadas da fração butanólica de semente de *C. pallida*, utilizando a linhagem geneticamente modificada BY4741 de *S. cerevisiae*, sendo as médias das unidades de fluorescência do extrato comparadas com as do controle negativo (DMSO a 10%).

Fluorescência do C+ (17- β -estradiol): 9099 ± 54

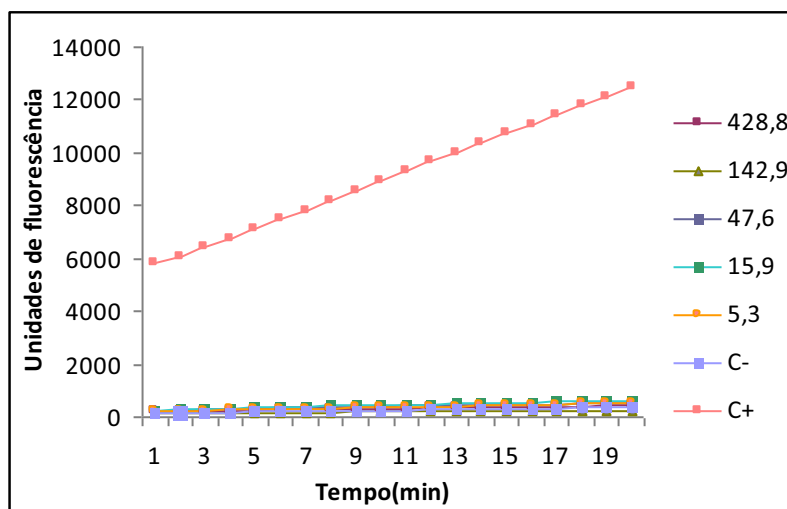


Figura 41: Cinética fração butanólica de semente de *C. pallida*, mostrando as unidades de fluorescência em função do tempo das cinco concentrações ($\mu\text{g/poço}$) e dos controles negativo (DMSO a 10%) e positivo (10 nM de estradiol).

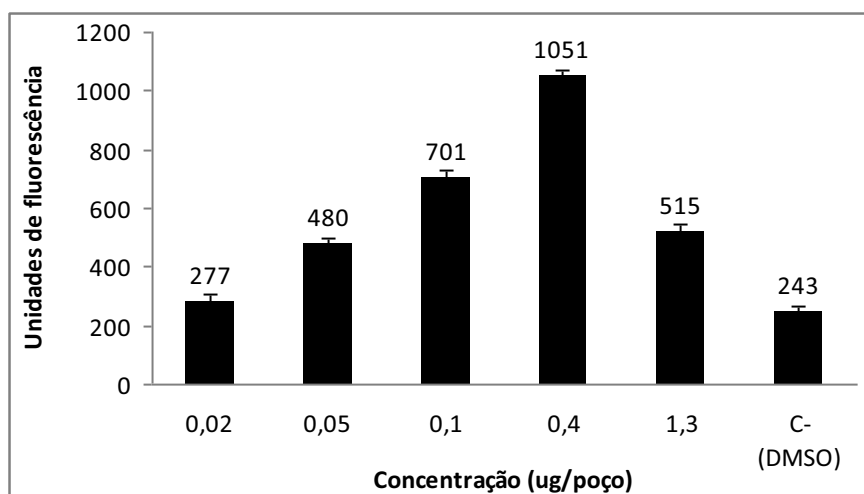


Figura 42: Atividade estrogênica, expressa em unidades de fluorescência, das diferentes concentrações testadas da fração alcaloídica de semente de *C. pallida*, utilizando a linhagem geneticamente modificada BY4741 de *S. cerevisiae*, sendo as médias das unidades de fluorescência do extrato comparadas com as do controle negativo (DMSO a 10%).

Fluorescência do C+ (17- β -estradiol): 9126 ± 249

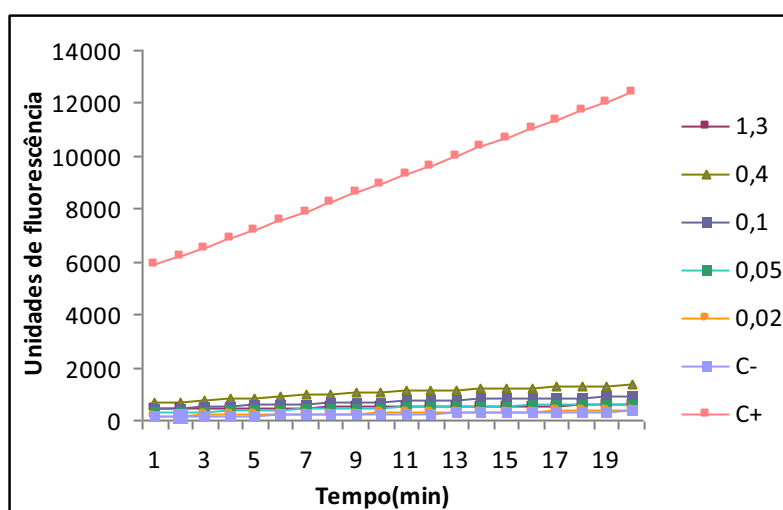


Figura 43: Cinética fração alcaloídica de semente de *C. pallida*, mostrando as unidades de fluorescência em função do tempo das cinco concentrações ($\mu\text{g/poço}$) e dos controles negativo (DMSO a 10%) e positivo (10 nM de estradiol).

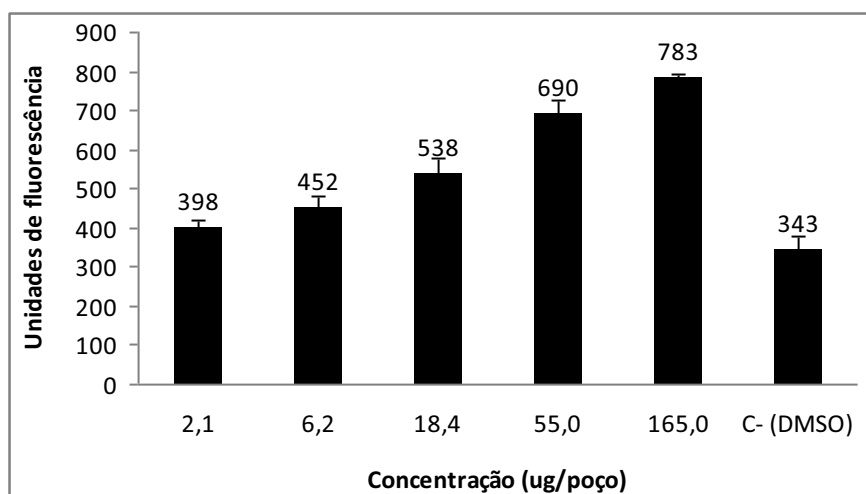


Figura 44: Atividade estrogênica, expressa em unidades de fluorescência, das diferentes concentrações testadas da fração diclorometânica de pericarpo de *C. pallida*, utilizando a linhagem geneticamente modificada BY4741 de *S. cerevisiae*, sendo as médias das unidades de fluorescência do extrato comparadas com as do controle negativo (DMSO a 10%).

Fluorescência do C+ (17- β -estradiol): 13057 ± 254

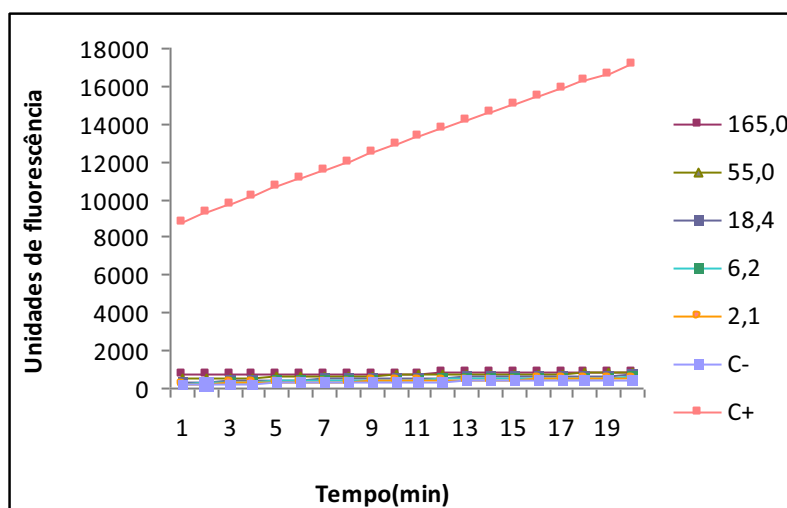


Figura 45: Cinética fração diclorometânica de pericarpo de *C. pallida*, mostrando as unidades de fluorescência em função do tempo das cinco concentrações ($\mu\text{g/poço}$) e dos controles negativo (DMSO a 10%) e positivo (10 nM de estradiol).

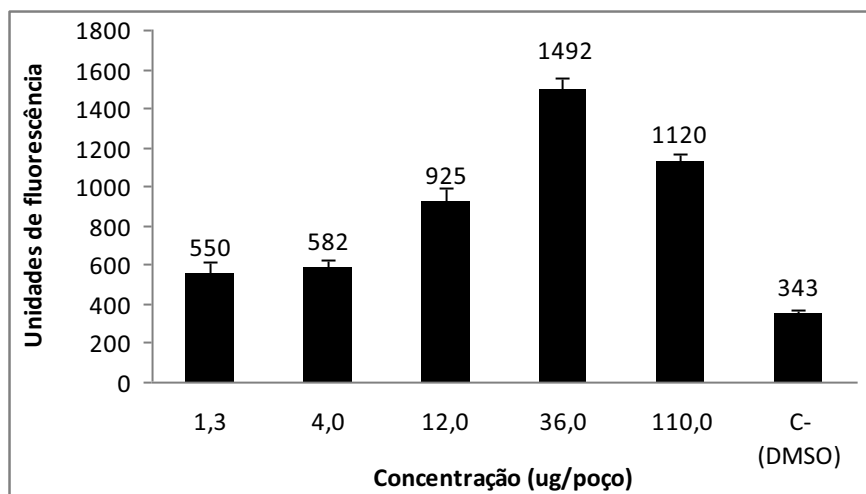


Figura 46: Atividade estrogênica, expressa em unidades de fluorescência, das diferentes concentrações testadas da fração clorofórmica de pericarpo de *C. pallida*, utilizando a linhagem geneticamente modificada BY4741 de *S. cerevisiae*, sendo as médias das unidades de fluorescência do extrato comparadas com as do controle negativo (DMSO a 10%).

Fluorescência do C+ (17- β -estradiol): 13057 ± 254

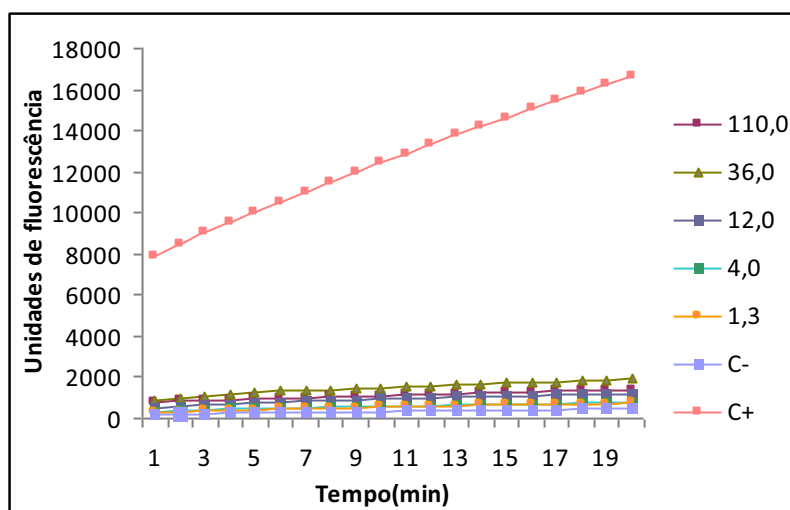


Figura 47: Cinética fração clorofórmica de pericarpo de *C. pallida*, mostrando as unidades de fluorescência em função do tempo das cinco concentrações ($\mu\text{g/poço}$) e dos controles negativo (DMSO a 10%) e positivo (10 nM de estradiol).

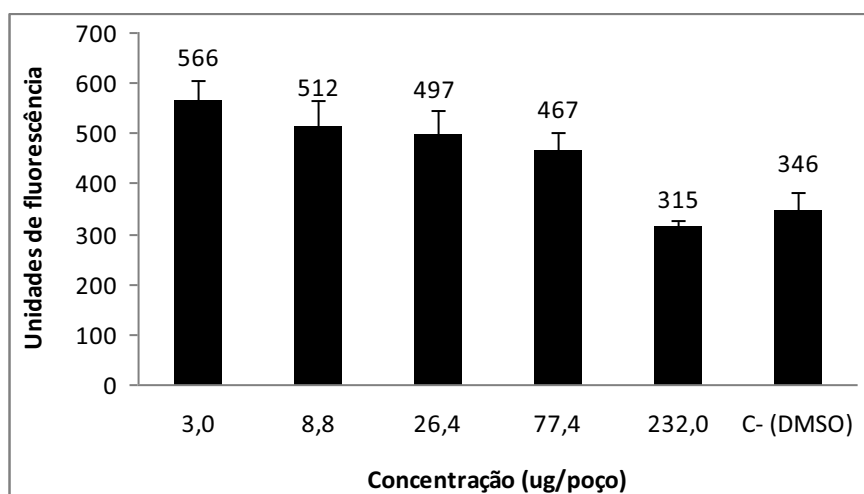


Figura 48: Atividade estrogênica, expressa em unidades de fluorescência, das diferentes concentrações testadas da fração butanólica de pericarp de *C. pallida*, utilizando a linhagem geneticamente modificada BY4741 de *S. cerevisiae*, sendo as médias das unidades de fluorescência do extrato comparadas com as do controle negativo (DMSO a 10%).

Fluorescência do C+ (17- β -estradiol): 13724 \pm 669

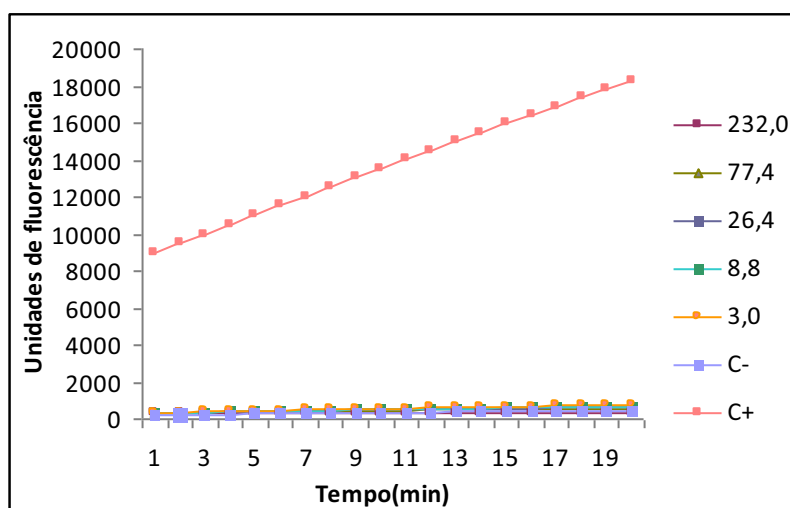


Figura 49: Cinética fração butanólica de pericarp de *C. pallida*, mostrando as unidades de fluorescência em função do tempo das cinco concentrações ($\mu\text{g/poço}$) e dos controles negativo (DMSO a 10%) e positivo (10 nM de estradiol).

4.7.7. Análise da atividade estrogênica por meio da avaliação da atividade da β -galactosidase, expressa em unidades de fluorescência, do estigmasterol isolado da fração diclorometânica de folhas de *C. pallida*

A Figura 50 apresenta a atividade estrogênica, expressa em unidades de fluorescência, do estigmasterol isolado de folhas de *C. pallida*, sendo as médias de fluorescências comparadas com as do controle negativo (DMSO a 10%). Esta amostra foi capaz de gerar ativação da enzima β -galactosidase, em todas as concentrações testadas, sendo as unidades de fluorescências bem maiores que as encontradas no controle negativo. O comportamento da amostra durante os 20 minutos de leitura foi disposto na Figura 51.

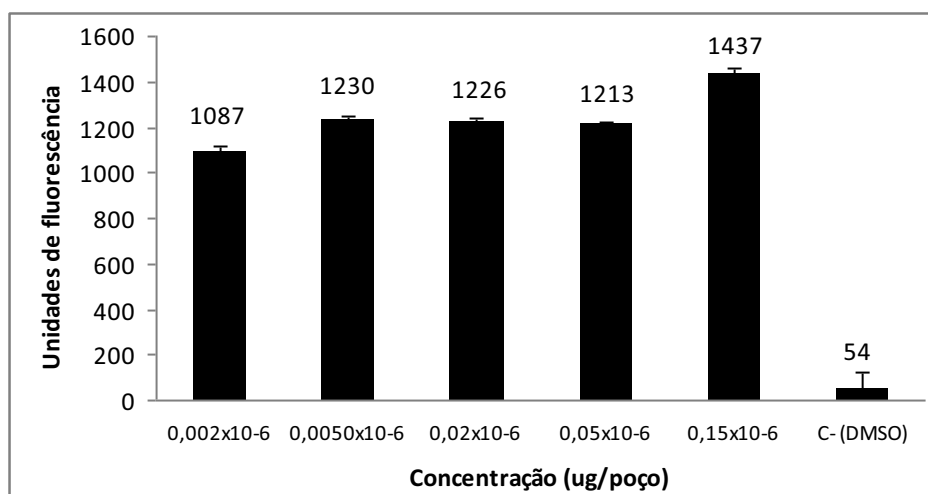


Figura 50: Atividade estrogênica, expressa em unidades de fluorescência, das diferentes concentrações testadas de estigmasterol proveniente de folhas de *C. pallida*, utilizando a linhagem geneticamente modificada BY4741 de *S. cerevisiae*, sendo as médias das unidades de fluorescência do extrato comparadas com as do controle negativo (DMSO a 10%).

Fluorescência do C+ (17- β -estradiol): 9678 ± 167

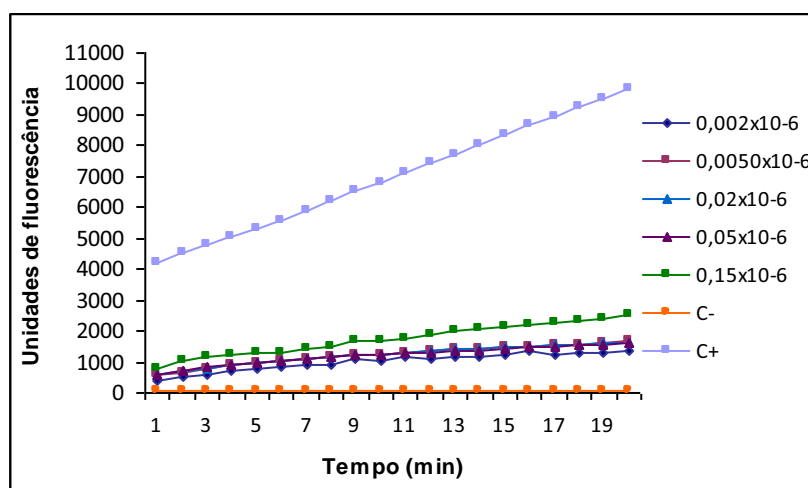


Figura 51: Cinética do estigmasterol proveniente de folhas de *C. pallida*, mostrando as unidades de fluorescência em função do tempo das cinco concentrações ($\mu\text{g/poço}$) e dos controles negativo (DMSO a 10%) e positivo (10 nM de estradiol).

5. DISCUSSÃO

5.1. Atividade mutagênica

Os vegetais fazem parte da vida humana desde os primórdios sendo utilizados na alimentação, habitação, vestuário, meios de transporte e na reabilitação da saúde (SIMÕES *et al.*, 2004).

Há séculos a humanidade busca na natureza, principalmente nos vegetais, a cura para diversas moléstias. O emprego de plantas no tratamento de doenças começou de maneira empírica, e desde os primórdios até os dias atuais as plantas são importantes recursos terapêuticos (QURISHI *et al.*, 2011).

Embora muitas plantas possuam inúmeras propriedades farmacológicas descritas, bem como uso popular relatado, é de grande importância a realização de ensaios que possam assegurar a utilização dos mesmos, já que comumente encontram-se entre os constituintes de extratos vegetais compostos com ação citotóxica ou genotóxica que podem ser associados ao desenvolvimento de tumores (AMES, 1983).

Espécies vegetais utilizadas popularmente têm sido avaliadas quanto ao potencial mutagênico em vários países e muitas delas têm promovido algum tipo de alteração no DNA (ELGORASHI *et al.*, 2003). Um desses exemplos é a espécie *Ocotea duckei* Vattimo, comum no nordeste brasileiro, que embora possua várias aplicações terapêuticas populares como antialérgica e antiplaquetária, seus extratos demonstraram potencial mutagênico (MARQUES *et al.*, 2003).

Segundo estudos realizados por Santos *et al.* (2006), o extrato metanólico de *Strychnos pseudoquina*, uma espécie característica do cerrado brasileiro, utilizada popularmente para o tratamento de úlceras gástricas, apresentou efeito mutagênico *in vivo* e *in vitro*.

Estudos de mutagenicidade e anti-mutagenicidade com plantas têm crescido juntamente com o aumento do uso terapêutico, com o interesse em comprovar a eficácia das mesmas nas mais diversas finalidades farmacológicas (JIMENÉZ *et al.*, 2005). Dentro deste contexto, o teste de Ames foi empregado no presente trabalho tendo como objetivo a avaliação das plantas quanto ao risco de mutagenicidade, já que é uma

metodologia de alta reprodutibilidade para detecção de mutágenos (MORTELMANS & ZEIGER, 2000) além de ser reconhecido mundialmente por sua eficiência na detecção de mutações pontuais por diferentes agentes (SANTOS, 2006).

Os resultados obtidos trouxeram informações importantes no que se diz respeito à segurança da utilização de diferentes partes das plantas testadas.

Em relação ao extrato de folhas e ao extrato de caule de *M. hirtum*, o teste de Ames não evidenciou atividade mutagênica para nenhuma das linhagens e concentrações testadas, tanto na presença quanto na ausência de metabolização enzimática. Os constituintes desses extratos não foram capazes de causar dano ao material genético pelo mecanismo de *frameshift* nem por substituição de par de base. A importância desses resultados está relacionada à utilização popular desse gênero e nas propriedades farmacológicas já descritas.

Estudos fitoquímicos demonstraram a presença de flavonoides glicosilados em folhas de *M. hirtum*, como saponarina (apigenina-6-C- β -D- glucopiranosil-7-O-D- glucopiranosídeo), que se mostrou majoritária, além de isovitexina (apigenina-6-C- β -D- glucopiranosídeo) e isoorientina (luteolina-6-C- β -D- glucopiranosídeo). Já no caule foi identificada uma mistura de triterpenoides (α e β -amirina), além de alantoína (TANGERINA, 2012).

Em relação ao estudo do potencial mutagênico de flavonoides, Rietjens *et al.* (2005), descreve que algumas características na estrutura do flavonoide (Figura 52) são essenciais para que a atividade mutagênica esteja presente, como por exemplo: hidroxila livre na posição 3 do anel C, dupla ligação entre as posições 2 e 3 e grupo ceto na posição 4. Essas características são fundamentais para o aparecimento de atividade mutagênica, pois permite que a hidroxila na posição 3 tautomerize a molécula para uma molécula 3-ceto.

Em relação aos flavonoides identificados nestes extratos, pode-se verificar que em nenhum deles a hidroxila na posição 3 do anel C é encontrada. Embora eles contemplem as demais características, a atividade mutagênica não foi observada nos mesmos, permitindo sugerir que a ausência desta hidroxila elimina a mutagenicidade.

Takemura *et al.* (1981) verificaram que flavonoides glicosilados tinham a sua porção açúcar hidrolisada por β -glicosidases, do trato digestivos e que isso resultava na liberação da sua forma aglicona. Assim, após o ensaio de metabolização enzimática (fração S9), é de se sugerir a presença desses flavonoides na sua forma aglicona, apigenina e luteolina. Em relação à estrutura química dessas agliconas (Figuras 53 e 54), pode-se notar que mesmo com o restabelecimento de outras hidroxilas, após a perda do açúcar, a hidroxila 3 do anel C permanece inexistente, o que explica a ausência de atividade mutagênica mesmo após a metabolização. Isso pôde ser verificado no estudo desenvolvido por Resende *et al.* (2012), em que luteolina, na sua forma aglicona, não se mostrou mutagênica quando analisadas pelo teste de Ames, empregando as linhagens TA98, TA100 e TA102 de *S. typhimurium*, na presença e ausência de metabolização enzimática.

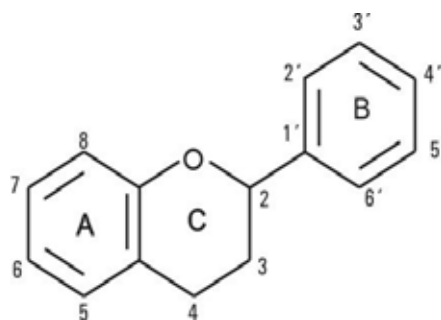


Figura 52: Estrutura básica dos flavonóides

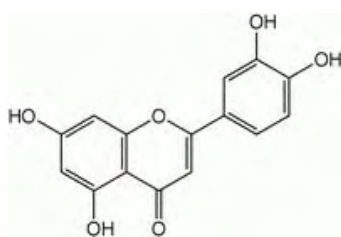


Figura 53- Luteolina

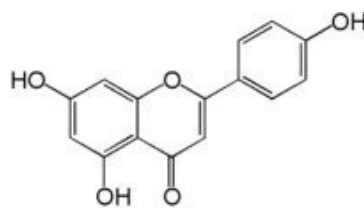


Figura 54- Apigenina

Em relação aos triterpenóides α e β -amirina (Figura 3) presentes no extrato de caule de *M. hirtum*, não foram encontrados estudos que creditassem atividade mutagênica e genotóxica aos triterpenóides. Um estudo conduzido com uma mistura de triterpenóides (α -amirina e β -amirina), empregando o teste do micronúcleo em

camundongos, não evidenciou atividade mutagênica (VILLASEÑOR *et al.*, 2004). Pelo contrário, vários trabalhos revelam atividades biológica promissoras para esses compostos como atividade antimutagênica (RESENDE *et al.*, 2006) e atividade antitumoral (FUKUDA *et al.*, 2006).

No caso da alantoína, identificada em caule de *M. hirtum*, um estudo conduzido por Andrews *et al.* (1984) mostrou que ela não foi mutagênica quando avaliada pelo teste de Ames, o que concorda com a ausência de mutagenicidade do extrato em que esta substância esteve presente.

Em relação ao gênero *Crotalaria*, o teste de Ames mostrou resultados importantes, que demonstraram o potencial mutagênico dos extratos de folhas e de semente.

Os perfis cromatográficos de todos os extratos de *C. pallida* também demonstraram a presença de flavonoides, principalmente derivados da apigenina e luteolina. Como já discutido anteriormente sobre as características estruturais de flavonoides essenciais para que a atividade mutagênica esteja presente, acredita-se que a mutagenicidade positiva desempenhada por estes extratos não se deve a presença dessas flavonas.

Como a literatura traz informações à respeito de grande quantidade de alcaloides pirrolizidínicos em espécies de *Crotalaria*, a fitoquímica procurou identificar alguns desses alcaloides. A partir da compreensão dos resultados obtidos pela fitoquímica foi possível sugerir a presença de um AP, o 7 hidróxi-1-metil-enepirrolizidino. Muito provavelmente a atividade mutagênica encontrada nos extratos e frações deve-se à presença desses alcaloides, visto que é bem estabelecido que a presença de AP em plantas pode oferecer riscos para o gado, animais selvagens e até mesmo para seres humanos (FUU *et al.*; 2004).

O extrato de folhas de *C. pallida* mostrou-se mutagênico para a linhagem TA98, pelo mecanismo de deslocamento do quadro de leitura, na ausência de metabolização, mostrando que há nesse extrato agente(s) mutagênico(s) direto(s), ou seja, aquele(s) que causa(m) dano diretamente ao DNA, sem necessitar de metabolização prévia. Ao analisar a atividade mutagênica das frações obtidas desta parte da planta, notou-se que

essa atividade manteve-se presente apenas na fração clorofórmica. Muito provavelmente, essa mutagenicidade se deve à presença de alcalóides pirrolizidínicos de *C. pallida*, que possam estar mais concentrados nessa fração.

Para o extrato de semente foi observada mutagenicidade positiva para todas as linhagens testadas na presença e ausência de metabolização. De acordo com as linhagens envolvidas, os mutágenos diretos e indiretos, presentes neste extrato, podem atuar pelo mecanismo de *frameshift*, substituição de pares de bases ou ainda atuar por mecanismos oxidativos.

Buscando identificar em qual das frações enriquecidas de semente a atividade mutagênica permanecia, o teste de Ames mostrou que essa atividade manteve-se apenas na fração alcaloídica, na ausência de metabolização, comprovando que os alcalóides presentes na planta contribuem para que a mutagenicidade esteja presente.

Alcalóides pirrolizidínicos são comumente encontrados em milhares de plantas e, embora nem todos sejam hepatotóxicos, os com essa propriedade geralmente são ésteres alílicos e ácidos de cadeia ramificada, como ocorrem em plantas dos gêneros *Senecio*, *Crotalaria*, *Cynoglossum*, *Heliotropium*, e *Trichodesma* (SCHOENTAL, 1995).

Estudos prévios demonstraram que os alcalóides são capazes de induzir aberrações cromossômicas em linhagem celular CHO (*chinese hamster ovary*) (SASAKI *et al.*, 1992), mutagenicidade em células pulmonares de hamster chinês (CHL) (NAKAYASY *et al.*, 1983), induzir trocas entre cromátides irmãs de linfócitos periféricos humanos (MADLE *et al.*, 1981) e aumentar a frequência de micronúcleo e trocas entre cromátides irmãs em células meristemáticas de *Allium cepa* (HAZEN e GUTIÉRREZ-GONZÁLES, 1988). Além disso, também são descritas propriedades hepatotóxica, mutagênicas e carcinogênicas desencadeadas por APs (BUCKEL e TOWARD, 1998).

Provavelmente, a atividade hepatotóxica desempenhada pelos APs se deve à alta reatividade dos derivados pirrólicos alquilantes, gerados durante a metabolização enzimática (PETZINGER, 2011). Tanto a molécula do alcalóide quanto seus metabólitos são agentes alquilantes reativos, capazes de formar ligações covalentes

estáveis com macromoléculas (LOUREIRO *et al.*, 2002; GRIFFEN e SEGALL, 1986). Devido à capacidade de interação com o material genético, tem sido evidenciado o envolvimento de APs com a mutagenicidade e a carcinogênese (LOUREIRO *et al.*, 2002).

Embora muitos compostos de origem vegetal demonstrem ter considerável atividade farmacológica, algumas propriedades indesejáveis, como mutagenicidade, carcinogenicidade e toxicidade, podem restringir seu uso como agentes terapêuticos (SIMÕES *et al.*, 1999), o que pôde ser verificado em relação aos extratos de *C. pallida*, que mesmo possuindo uso popular descrito e inúmeras propriedades farmacológicas, demonstraram, no presente trabalho, possuir como propriedade indesejável a atividade mutagênica.

5.2. Envolvimento de COX-2 em processos cancerígenos

Assim como as mutações, os processos inflamatórios aparecem muitas vezes como precursores da carcinogênese. O gene COX-2 é um dos envolvidos nesse processo, que catalisa a síntese de prostaglandinas, as quais estão associadas às vias de promoção tumoral (ANTONUCCI, 2005).

Estudos vêm sugerindo que as PGs e a enzima COX-2 podem ter um papel no desenvolvimento de malignidades, sendo já estabelecido que a forma induzida de COX (COX-2) tem sido detectada em tumores humanos e modelos experimentais de câncer (CHAN *et al.*, 1999).

Os mecanismos pelos quais a superexpressão da enzima COX-2 contribui para a carcinogênese se dão através da estimulação da proliferação celular, inibição da apoptose, estímulo da angiogênese, sendo todos estes efeitos mediados via PGE2 (CHAN, 2002; DAI e WANG, 2006; SCARTOZZI *et al.*, 2004).

Numerosos estudos têm demonstrado que os níveis de prostaglandinas encontram-se elevados em vários tipos de câncer, quando comparados com tecidos normais. A forma induzida da cicloxigenase, responsável pela biossíntese de PGs, tem sua expressão aumentada em tumores de cólon (HWANG *et al.*, 1998). Da mesma

forma, a indução da COX-2 ocorre em resposta a um processo inflamatório causado por danos provenientes da radiação UVB. Este processo de inflamação tem sido relacionado à formação de tumor (WILGUS *et al.*, 2000).

Outras pesquisas têm associado a expressão de COX-2 com a carcinogênese de pulmão, mama, cabeça e pescoço (SOSLOW *et al.*, 2000); GILHOOLY e ROSE, 1999; CHAN *et al.*, 1999). Rigas *et al.* (1993) e Pugh e Rhomas (1994) demonstraram elevação de níveis séricos e da mucosa de PGE2 em câncer de cólon.

A literatura mostra que a expressão de COX-2 pode estar envolvida na progressão do câncer (JOO *et al.*, 2002). Higashi *et al.* (2000) puderam verificar uma expressão aumentada da proteína COX-2 em linhagens de células de câncer de pele e carcinoma cutâneo escamoso, quando comparada a linhagens de células não tumorigênicas de queratinócitos humanos, e que a COX-2 exerce um papel de pivô na regulação do crescimento celular.

O estudo desenvolvido por Kin *et al.* (2011) mostrou que a inflamação crônica desempenha um papel importante na carcinogênese da próstata. Verificou-se que a superexpressão de COX-2 no câncer de próstata está associada à diminuição da apoptose e ao aumento da angiogênese. Além disso, a inflamação crônica presente na hiperplasia benigna prostática induz um aumento na expressão de COX-2, ocasionando aumento de citocinas inflamatórias.

O nível COX-2 em adenomas de ratos também foi aumentado, como apresentado no estudo delineado por Williams *et al.* (1996). Em tecidos adenomatosos, a enzima teve uma expressão três vezes maior quando comparada à expressão em mucosa normal. Os autores concluíram que os níveis de COX-2 podem ser aumentados em estágios iniciais de neoplasias colorretais, durante a formação de pólipos e antes da invasão.

Visto que COX-2 não é apenas um marcador de inflamação, mas está ativamente envolvida no processo de carcinogênese (TSUJII *et al.*, 1998), o presente trabalho buscou avaliar se as amostras que se apresentaram altamente mutagênicas quando avaliadas pelo teste de Ames, também são capazes de estimular um processo inflamatório, o que contribuiria com o processo de carcinogênese. Para tanto, a

verificação da ativação de COX-2 foi realizada indiretamente, a partir da quantificação de prostaglandina (PGE2).

Anteriormente à quantificação de PGE2, foi realizada a quantificação de óxido nítrico como triagem para verificar se as amostras teriam potencial pró-inflamatório, já que no processo inflamatório, os macrófagos promovem a liberação de diversas substâncias, como por exemplo, produtos reativos do nitrogênio, como o NO (NAPOLITANO *et al.*, 2005).

O NO é um mediador que regula as respostas imunes humorais e celulares na inflamação, possuindo propriedades inflamatórias. É produzido em muitos tecidos pela enzima óxido nítrico sintetase durante a transformação catalítica da L-arginina em citrulina (MOILANEN e VAPAATALO, 1995).

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 NO reflete o potencial de estimulação imunológica, e o excesso pode contribuir para a indução de patologias inflamatórias (PUNTUREE *et al.*, 2004)

Sabendo que o gene COX-2 é um dos envolvidos no processo de carcinogênese e que a enzima COX-2 catalisa a síntese de prostanoídes, como as prostaglandinas, através da ação de fosfolipase A, quantificou-se PGE2 como uma maneira de mensurar a ativação da COX-2. Isso porque PGE2 é um produto primário do metabolismo do ácido araquidônico sob ação da ciclooxigenase (MURAKAMI *et al.*, 1999).

Tanto o extrato quanto a fração alcaloídica, provenientes de semente de *C. pallida*, não demonstraram características inflamatórias, já que não foram capazes de induzir uma produção significativa tanto de NO quanto de PGE2. Assim, se estas amostras tiverem a capacidade de atuar no desenvolvimento de um processo carcinogênico, a mutagenicidade poderá estar agindo efetivamente, não estando um processo inflamatório contribuindo neste processo.

Estes resultados concordam com dados da literatura que mostram que algumas substâncias isoladas de *C. pallida*, como apigenina e crotafuranos, desempenharam atividade anti-inflamatória em modelos murinos, diminuindo a produção de NO por macrófagos (WENG, 2003). Em outro trabalho, flavonoides diversos e uma nova

isoflavona isolada de *C. pallida*, demonstraram potencial anti-inflamatório, sendo capazes de suprimir a liberação de mediadores químicos por células inflamatórias, mostrando alto potencial no tratamento e na prevenção de doenças inflamatórias centrais e periféricas associadas com excesso de produção de mediadores químicos (KO *et al.*, 2004).

5.3. Atividade estrogênica

Desde a descoberta dos estrógenos não esteroidais, muitos compostos com atividade estrogênica agonista e antagonista têm sido desenvolvidos como agentes de regulação da fertilidade, reposição hormonal na pós-menopausa e prevenção e controle de cânceres hormônio-sensíveis (OGAWA *et al.*, 2009).

Os fitoestrógenos demonstram ter potencial terapêutico e preventivo na ginecologia. Recentemente, com interesse na segurança, tem sido documentada a utilização de fitoestrógenos na terapia de reposição hormonal em substituição ao estrógeno (HAYS *et al.*, 2003). Resultados de estudos epidemiológicos sugerem que a ingestão diária de alimentos contendo fitoestrógenos pode ter um papel protetor do câncer de mama e de outros cânceres hormônio-dependentes (ADLERCREUTZ, 2002; ZAND *et al.*, 2002).

Vários dos mais potentes fitoestrógenos conhecidos pertencem ao grupo das isoflavonas, constituintes fitoquímicos encontrados predominante nos grãos de soja. No entanto, dados de Micsicek (1993, 1994) indicam que outras classes da família flavonoide, além das isoflavonas, exibem propriedades estrogênicas e antiestrogênicas, e são designados flavo-estrógenos.

Esses compostos possuem algumas semelhanças estruturais com o hormônio natural estradiol, bem como com outros hormônios esteróides (ZAND *et al.*, 2000), podendo interagir com o RE e induzir a expressão gênica semelhante a do hormônio estrogênio, embora a uma menor afinidade (FERGUSON, 2001).

A química medicinal foi bastante privilegiada com as contribuições fornecidas pelo desenvolvimento da química computacional e da biologia molecular, que permitiu a determinação de novos alvos moleculares e novas metodologias para o estudo e

produção de fármacos. Uma dessas contribuições foi em relação ao desenvolvimento de fármacos moduladores seletivos de receptores, como no caso de receptores hormonais esteroidais (YUNES *et al.*, 2001).

Os receptores esteroidais são flexíveis podendo se associar a diversos ligantes. Algumas características são essenciais para que esta ligação ocorra, como por exemplo, a presença de grupo hidroxila que mimetize a hidroxila na posição 3 do anel ciclopentanohidrofenantreno (núcleo esteroide) (YUNES *et al.*, 2001). Deste modo, pode-se afirmar que este grupo é o farmacofórico, ou seja, o grupamento necessário para que a atividade esteja presente (PATRICK, 1995).

No caso dos estrógenos, hormônios cuja estrutura fundamental é o estradiol, o "farmacóforo" é representado por dois grupamentos (hidroxilas) que podem fazer ligação de hidrogênio, separados através de uma estrutura lipofílica, por uma distância aproximada de 1 nanômetro (Figura 55) (YUNES *et al.*, 2001).

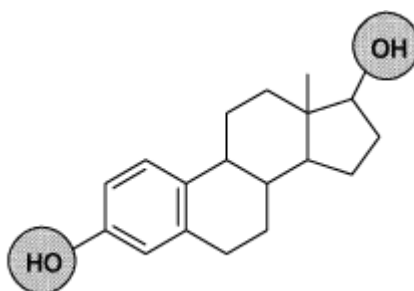


Figura 55: Estrutura do estradiol com o grupo farmacofórico: Duas hidroxilas separadas por uma estrutura lipofílica de 1 nanômetro (YUNES *et al.*, 2001).

Sabendo dessas informações, muitas pesquisas se concentram na busca de alternativas ao estrógeno, que contemplem estas características, para serem utilizados na terapia de reposição hormonal durante a menopausa. Os estrógenos e outros ligantes influenciam a expressão de genes e mudanças fenotípicas das células através da ligação a receptores nucleares de estrógenos: receptores α -estrogênico (RE α) e receptores β -estrogênico (RE β) (PIERSEN, 2003). Essa ligação ativa a dimerização dos REs, facilitando a interação direta entre os dímeros e as regiões promotoras de genes alvos do

DNA, e recrutam outros componentes da maquinaria de transcrição, que levam à expressão gênica (OGAWA *et al.*, 2009).

As duas isoformas de REs pertencem a uma superfamília de receptores hormonais que se tornam fatores de transcrição quando estão ligadas aos respectivos ligantes (OSBORNE *et al.*, 2000). Tanto os receptores α quanto o β , apresentam elevada homologia no domínio de ligação ao DNA, e homologia moderada no domínio de ligação ao ligante (GUSTAFSSON, 1999; SHEN *et al.*, 2007).

Devido ao grande interesse na busca de compostos com atividade estrogênica que possam ser empregados na terapia de reposição hormonal, esse estudo utilizou o teste de RYA que utiliza como modelo experimental leveduras recombinantes, onde a transcrição de um gene repórter depende da presença no meio de compostos capazes de se ligar ao receptor de estrógeno (GARCIA-REYERO *et al.*, 2001).

Os extratos de folhas e de caule de *M. hirtum* não demonstraram potencial estrogênico pelo teste de RYA. Os valores obtidos de equivalentes em estradiol foram baixos e as concentrações testadas geraram unidades de fluorescências semelhantes às obtidas pelo controle negativo. Isso significa uma menor ativação do gene repórter, o qual foi construído de forma que a enzima só será expressa como resposta da ligação de substâncias aos receptores de estrógeno. Portanto, nestes extratos não há compostos com grande afinidade pelo receptor de estrógeno humano, sendo baixa a formação do complexo receptor-ligante.

Como já mencionado, estudos fitoquímicos demonstraram a presença de flavonoides glicosilados em folhas de *M. hirtum*, como saponarina (apigenina-6-C- β -D-glucopiranosil-7-O-D- glucopiranosídeo, que se mostrou majoritária, além de isovitexina (apigenina-6-C- β -D- glucopiranosídeo) e isoorientina (luteolina-6-C- β -D-glucopiranosídeo). Já no caule foi identificada uma mistura de triterpenoides (α e β -amirina) e alantoína (TANGERINA, 2012).

Em relação à estrutura dos flavonoides e a possível atividade estrogênica, Zand *et al.* (2000) afirmam que hidroxila na posição 6, 7 ou 4' do flavonoide confere maior atividade estrogênica e os compostos mais potentes apresentam de 2 a 4 hidroxilas, sendo pelo menos uma na posição 7 do anel A e a outra na posição 4' do anel B. A presença destas hidroxilas são fundamentais para que a atividade estrogênica esteja

presente pois mimetizam as hidroxilas na posição 3 e 17 encontradas na molécula do estradiol (LE BAIL *et al.*, 1998). Além disso, a presença de dupla ligação entre os carbonos 2 e 3 do anel C é essencial para que a atividade estrogênica esteja presente (ZAND *et al.*, 2000).

O composto majoritário das folhas de *M. hirtum* é saponarina, uma apigenina glicosilada, que possui alguns dos requisitos necessários de um bom ligante ao RE. Dentre esses requisitos encontram-se a presença hidroxila na posição 4' do anel C e dupla ligação entre carbonos 2 e 3 do anel C. Entretanto, não é encontrada a hidroxila na posição 7 do anel A, a qual é fundamental para que ocorra a interação com os REs, o que permite afirmar que a ausência desta hidroxila foi a responsável para que a atividade estrogênica não estivesse presente no extrato de folhas de *M. hirtum*.

Já a isovitexina, outra apigenina glicosilada, possui todas as características de um bom agente estrogênico (hidroxilas na posição 4' e 7, dupla ligação ente carbono 2 e 3), porém isso não foi suficiente para que a atividade estrogênica estivesse presente no extrato. Isso pode ser explicado pelo fato desta não ser a substância majoritária e, portanto, não haveria uma concentração suficiente para desempenhar tal atividade, ou ainda, pelo fato de que a presença do açúcar na posição 6 do anel A pudesse estar oferecendo impedimento estérico, dificultando a ligação da molécula ao receptor estrogênico.

Nas plantas, fitoestrógenos ocorrem predominantemente como glicosídeos que no momento do consumo são hidrolisadas por glicosidases intestinais liberando agliconas (WARD e KUHNLE, 2010). Como o RYA é realizado com leveduras e as mesmas não contam com sistemas enzimáticos, não podemos sugerir a presença nos extratos, de apigenina na sua forma aglicona, a qual teria todas as características para ser um bom agente estrogênico.

Ainda nas folhas de *M. hirtum*, foi encontrado a isoorientina, uma luteolina glicosilada, que conta também com as características de um bom estrogênico, como as hidroxilas 4' e 7, mimetizando as encontradas na molécula do 17- β -estradiol e dupla ligação entre carbonos 2 e 3. Porém, uma característica importante na estrutura desta luteolina, é o posicionamento *orto* existente entre as hidroxilas presentes no anel C. De

acordo com Choi *et al.* (2008), este tipo de posicionamento reduz a estrogénicidade por dificultar a interação da molécula com os REs.

Embora esses flavonoides presentes nos extratos de *M. hirtum* possuam alguns requisitos de bons ligantes aos REs, os mesmos não foram capazes de demonstrar atividade estrogénica pelo teste de RYA. Essas substâncias podem desempenhar tal atividade por vias independentes de receptores.

Como mecanismos independentes dos REs, os fitoestrógenos podem agir sob a aromatase, enzima que promove a conversão de andrógenos a estrógenos (RICE *et al.*, 2007; VIRK-BAKER *et al.*, 2010; DAMIANI e DAMIANI, 2007), estimulação da globulina que se liga aos hormônios sexuais, especificamente a testosterona e o estradiol, alterações no metabolismo do estrogênio e inibição de reciclagem entero-hepática de estrógenos endógenos e xenobióticos (PIERSEN, 2003).

Como a levedura não contém receptores esteróides endógenos ou da tireóide, nem proteínas relacionadas à aromatase, e, devido ao teste de RYA simular apenas reações baseadas no mecanismo de interação do ligante ao receptor, o mesmo não permite avaliar alguns fatores, como a biodisponibilidade, metabolismo, bioativação e integração ao longo do tempo. Além disso, a permeabilidade da membrana celular pode diferir entre as cepas de levedura (GARCIA-REYERO *et al.*, 2004).

Levando-se em conta essas possibilidades, pode ser por isso que, mesmo luteolina e apigeninas glicosiladas, possuindo características estruturais de bons agentes estrogénicos, não contribuíram para resultados positivos pelo teste de RYA.

No entanto, o ensaio RYA é conhecido como um ensaio de *screen* inicial e o formato de placas de microtitulação o torna adequado para o *screening* rápido de um grande número de amostras (HAN *et al.*, 2002).

Em relação aos extratos analisados de *C. pallida*, todos demonstraram potencial estrogénico. Isso significa que há nesses extratos constituintes com alta afinidade pelo receptor de estrógeno, presente na levedura modificada, ocasionando a transcrição do gene repórter. O produto da transcrição deste gene é a enzima β -galactosidase, a qual só é expressa na presença do complexo receptor-ligante (CÉSPEDE *et al.*, 2005; NOGUEROL *et al.*, 2006). Portanto, quanto maior o potencial estrogénico da amostra,

maior a afinidade dos compostos aos receptores de estrogênio, e, portanto, maior a atividade da enzima (expressa em unidades de fluorescência).

Todos os extratos de *C. pallida* forneceram resultados importantes no teste de RYA, porém o extrato de folhas se mostrou mais estrogênico. Esse extrato forneceu um resultado em um valor de equivalente em estradiol de 14,3 nM, o que permite dizer que a amostra exerce uma atividade estrogênica semelhante a essa concentração de estradiol. Além disso, o extrato obteve um valor de EC 50 de 0,2 g/mL, mostrando ser o mais potente dentre os extratos analisados.

Como todos os extratos de *C. pallida* apresentaram resultados interessantes quanto à atividade estrogênica, as análises foram continuadas com as frações enriquecidas obtidas de cada parte da planta.

Nas frações de flores, a diclorometânica foi a que obteve destaque, visto que forneceu além de um valor de equivalente em estradiol de 19,9 nM, forneceu um EC50 de 0,2 g/mL. Já em relação às frações de pericarpo, a clorofórmica foi a que apresentou o melhor desempenho.

Dentre as frações analisadas, a diclorometânica de folhas e a alcaloídica de semente foram as que apresentaram os mais importantes resultados. A fração alcaloídica de semente, que obteve um valor em equivalente em estradiol de 13,9 nM, mostrou ser a mais potente dentre as frações analisadas, já que o valor de EC50 obtido foi de 0,004 g/mL.

A fração diclorometânica das folhas foi capaz de gerar um valor de equivalente em estradiol de 89,0 nM, mostrando que é necessária uma alta concentração de estradiol (89,0 nM) para estimular a mesma resposta que a amostra no teste de RYA tirar. Somado a isso, essa fração obteve um EC 50 de 0,1 g/mL.

Como a fração diclorometânica de folhas desta planta se destacou quanto ao potencial estrogênico e sendo esta fração a mais adiantada em relação ao estudo do perfil químico, houve grande interesse em se descobrir qual a substância responsável para que esta atividade estivesse tão evidente nas folhas. Dentro deste contexto, o estigmasterol foi isolado da fração diclorometânica de folhas de *C. pallida* e teve então sua atividade estrogênica avaliada pelo RYA.

Os resultados do teste de RYA para o estigmasterol mostraram que é provável que esta seja a substância responsável pela alta estrogenicidade obtida pelas folhas de *C. pallida*, já que o estigmasterol foi capaz de gerar alta ativação da enzima β -galactosidase, quando comparada ao controle negativo, fornecendo um resultado de equivalente em estradiol de 122,0 nM e valor de EC50 de $10,5 \times 10^{-7}$ g/mL.

O estigmasterol pertence à classe de fitoesteroides que são substâncias esteroidais ou terpenoides tetracíclicas extraídas de espécies vegetais. Dentre os fitoesteroides mais comuns estão o b-sisterol, o campesterol e estigmasterol (classificados como 4-desmetilesteróis do colestano, apresentando duplas ligações na posição C-5 do anel ciclopentanoperidrofenantreno). Quimicamente, são álcoois constituídos por 28 ou 29 átomos de carbono, semelhantes ao colesterol, cujas modificações envolvem a cadeia lateral e incluem a adição de ligações insaturadas e/ou grupamentos metila ou etila (AWAD, FINK, 2000).

As vantagens dos fitoesteroides se devem à biodegradabilidade, habilidade em afetar numerosos processos biológicos, atravessar membranas, ligar-se a receptores hormonais específicos e na capacidade de serem modificados por métodos sintéticos (SVOBODOVÁ *et al.*, 2011; SUSTEKOVÁ *et al.*, 2011)

Devido à similaridade do estigmasterol ao colesterol, há na literatura relatos de ação hipocolesterolêmica para este fitoesterol. O mecanismo de ação sugerido envolve saturação do enterócito, inibindo deste modo a absorção intestinal do colesterol biliar e da dieta, além de inibir a esterificação do colesterol pelos enterócitos e causar difusão ou transporte do colesterol não esterificado ao lúmen intestinal (MATVIENKO *et al.*, 2002). Em virtude da similaridade ao colesterol não é de se estranhar que o estigmasterol tenha afinidade por receptores hormonais, como evidenciado pelo teste de RYA.

É notável a similaridade estrutural existente entre o estigmasterol e a molécula do 17- β estradiol (Figura 56), justificando desta forma, a alta atividade estrogênica desempenhada por esta molécula quando avaliada pelo teste de RYA.

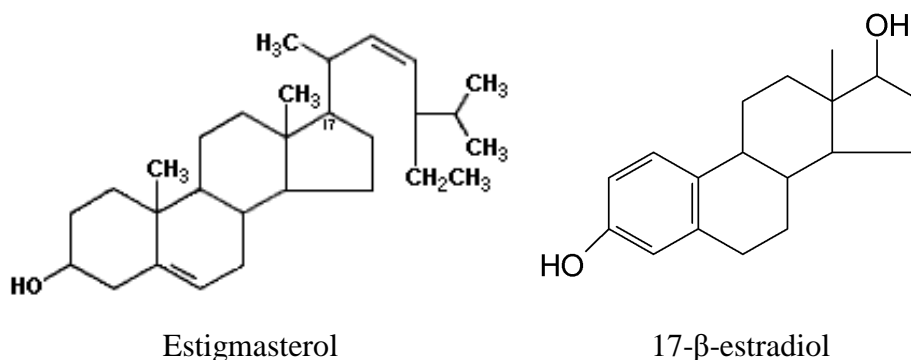


Figura 56: Estruturas químicas do estigmasterol e do 17-β-estradiol (NEWILL *et al.*, 2007)

Como um dos enfoques do trabalho foi a busca de compostos com atividade estrogênica que possam ser empregados na terapia de reposição hormonal, os resultados obtidos para o estigmasterol pelo teste de RYA, torna-o um possível candidato.

Pensando na segurança da utilização de compostos obtidos de plantas, decidiu-se realizar um teste de Ames, como uma triagem para verificação do potencial mutagênico do estigmasterol. Como resultado desta análise, não foi verificada atividade mutagênica em nenhuma das concentrações testadas pelo teste de Ames.

Fitoesteróis, como o estigmasterol, são conhecidos como antioxidantes (DE JING e PLAT, 2003) tendo papel na quimioprevenção de danos do DNA induzidos por radicais oxidativos (WANG *et al.*, 2003). O mecanismo exato pelo qual os fitoesteróides oferecem proteção contra o câncer não está elucidado, porém há teorias propostas como efeitos sobre: a estrutura de membranas celulares, enzimas ligadas à membrana, fluidez de membranas celulares, vias de transdução de sinais, apoptose, integridade da membrana, função imunológica, propriedades esterogênicas nos tecidos ou ainda efeito sobre esteróides ácidos e neutros no cólon (AWAD, FINK, 2000).

Lim *et al.* (2005) relataram o estigmasterol como sendo a substância com maior atividade antimutagênica em *Gleditsia sinensis* Lam., Leguminosae, obtendo como resultado uma redução de 51,2% e 64,2% do fator de indução contra os mutágenos MNNG (N-metil-N'-nitro-nitrosoguanidina) e 4-NQO (4-nitroquinolina-N-óxido),

respectivamente, por meio de ensaio *in vitro*, remetendo à indicação da sua aplicação como agente anticancerígeno, porém ressaltando a necessidade de estudos *in vivo*.

Substâncias com potencial antimutagênico aumentam a eficiência dos mecanismos de reparo das mutações causadas por agentes mutagênicos ou provocam a inativação da substância mutagênica. Como consequência, estas substâncias atuam como agentes protetores, diminuindo a frequência de danos ao DNA. Em ambos os casos, agem antes da multiplicação desordenada das células, ou seja, da formação do tumor (REZENDE *et al.*, 2004).

Com base em todos os resultados obtidos, o estigmasterol aparece como um candidato em potencial para a TRH, já que demonstrou excelentes resultados quanto à estrogenicidade pelo teste de RYA e ausência de atividade mutagênica quando avaliado pelo ensaio de Ames.

6. CONCLUSÕES

6.1. Avaliação do potencial mutagênico

- Os extratos de *M. hirtum*, tanto de caule quanto de folhas não induziram aumento significativo do número de colônias revertentes em nenhuma das linhagens e concentrações testadas;
- O extrato de flores e o extrato de pericarpo de *C. pallida* não demonstraram potencial mutagênico para as linhagens testadas;
- A mutagenicidade observada no extrato de folhas, frente à linhagem TA98, deve-se a um mutágeno direto, pelo mecanismo de deslocamento do quadro de leitura;
- A fração clorofórmica de folhas de *C. pallida* manteve a atividade mutagênica frente à linhagem TA98, na ausência de metabolização;
- O estigmasterol, isolado das folhas de *C. pallida*, não apresentou resultados positivos de mutagenicidade para a linhagem TA98 quando avaliado pelo teste de Ames;
- O extrato de semente de *C. pallida* apresentou mutagenicidade positiva para todas as linhagens testadas. Esse extrato possui tanto mutágenos diretos como indiretos, que causam mutação por diferentes mecanismos (substituição de par de bases, deslocamento do quadro de leitura, processos oxidativos);
- A fração alcaloídica, proveniente do extrato de semente de *C. pallida*, apresentou mutagenicidade positiva, quando na ausência de metabolização. Os alcaloides presentes nesta fração agem como um mutágeno direto, pelo mecanismos de deslocamento do quadro de leitura.

6.2. Envolvimento de processo inflamatório com a carcinogênese

- Tanto o extrato de semente quanto à fração alcaloídica de semente de *C. pallida*, não foram capazes de promover a estimulação de COX-2.

6.3. Avaliação da atividade estrogênica

- Os extratos de *M. hirtum*, sejam provenientes de folha ou de caule, não demonstraram potencial estrogênico para o teste de RYA;
- Os extratos de *C. pallida* (flores; folhas; semente; pericarpo) apresentaram resultados significativos para o teste de RYA, sendo o maior valor de estradiol equivalente apresentado pelo extrato de folhas;
- As frações butanólica, tanto de folhas quanto de pericarpo, não demonstraram potencial estrogênico;
- A fração diclorometânica de folhas de *C. pallida* foi a que forneceu maiores valores em equivalente em estradiol (89,0 nM);
- A fração com maior potência estrogênica foi a alcaloídica, proveniente de semente, que obteve valor de EC 50 de 0,004 g/mL;
- O estigmasterol, isolado da fração diclorometânica de *C. pallida*, forneceu o maior valor de equivalente em estradiol (122 nM) em relação as demais amostras avaliadas;

6.4. CONCLUSÃO GERAL

Os resultados da atividade mutagênica trouxeram alerta quanto à utilização popular de *C. pallida*, já que os extratos de folhas e de semente apresentaram resultados positivos quando avaliados pelo teste de Ames.

Como um dos objetivos do estudo era a busca por substituintes promissores para a terapia de reposição estrogênica, o estigmasterol demonstrou ser um candidato em potencial, já que apresentou excelentes resultados quanto à estrogenicidade pelo teste de RYA e ausência de atividade mutagênica quando avaliado pelo ensaio de Ames.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABELSON, H. T.; RABSTEIN, L. S. Influence of prednisilone on Moloney leukemogenic virus in BALB/c mice. **Cancer Res**, v. 30, p.2213-2222, 1970.

ADDAE-MENSAH, I. Towards a rational scientific basis for herbal medicine: A Phytochemist's two-decade contribution, Accra, Ghana University Press, pp. 305-307, 1992.

ADLERCREUTZ, H. Phyto-oestrogens and cancer. **Lancet Oncology**, v. 3, p. 364-373, 2002.

AHMED, B.; AL-HOWIRIN, T. A.; MOSSA, J. S. Crotalic and emarginelic acids: Two triterpenes from *Crotalaria emarginella* and anti-inflammatory and anti-hepatotoxic activity of crotalic acid. **Phytochemistry**, v. 67, p. 956-964, 2006.

ALLEN, O.N.; ALLEN, E.K. **The Leguminosae: a source book of characteristics, uses and nodulation**. University of Wisconsin Press. Wisconsin. 248p. 1981.

ALMEIDA, R. R. **Plantas medicinais brasileiras**. São Paulo: Hemus, 341p, 1993.

AMAROWICZ, R.; PEGG, R. B. Legumes as a source of natural antioxidants. **European Journal of Lipid Science and Tecnology**, v. 110, n. 10, p. 865-878, 2008.

AMES, B. N.; LEE, F. D.; DURSTON, W. E. An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens, **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 70, p. 782-786, 1973.

ANDREWS, A. W.; LJINSKY, W.; SNYDER, S. W. Mutagenicity of amine drugs and their products of nitrosation. **Mutat. Res.**, v. 135, n. 2, p. 105- 108, 1984.

ANIMASHAUN,T.; MAHMOOD, N.; HAY, A. J.; HUGHES, R. C. *J. Antiviral Chem. Chemother*, v.4, p. 145-153, 1993.

ANTONUCCI, G.A. Análise de mutações e da expressão do gene COX-2 e sua relação com a carcinogênese em pacientes portadores de melanoma e lesões de pele não melanoma. **Tese de Doutorado**. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 2005.

ARDIES, C.M. Inflammation as cause for scar cancers of the lung. **Integr Cancer Ther**, v.2, p.238-46, 2003.

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

BAE, E. A.; HAN, M. J.; CHOO, M. K.; PARK, S.Y.; KIM, D. H. Metabolism of 20(S)- and 20@- ginsenoside R-g3 by human intestinal bacteria and its relation to in

vitro biological activities. **Biological Pharmaceutical Bulletin**, v.25, n. 158, p. 58-63, 2002.

BASTOS, N. Contribuição ao estudo sistemático de algumas espécies do gênero *Machaerium* Persoon (Leguminosae- Papilionoideae) ocorrentes na Amazônia Brasileira. Boletim Museu Paraense Emílio Goeldi. **Sér. Bot.**, v. 3, n. 2, p. 97- 101, 1987.

BIRECKA, H.; CATALFAMO, J.L.; EISEN, R.N. A sensitive method for detection and quantitative determination of pyrrolizidine alkaloids. **Phytochemistry**, v. 20, n.2, p. 343-344, 1981.

BRAGANÇA, F. C. R. Considerações sobre o histórico dos medicamentos e plantas medicinais. **Plantas medicinais antidiabéticas: uma abordagem multidisciplinar**. Niterói, RJ, Editora da UFF, 1996.

BRASIL, Ministério da Saúde, Agencia Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Resolução – RDC Nº 17 de 24/02/2000. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF 25/02/2000), 2000.

BRASIL, Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. **POLÍTICA NACIONAL DE PLANTAS MEDICINAIS E FITOTERÁPICOS**, Brasília, DF. 2006.

BUCKEL, P.; TOWARD, A. A new natural medicine. **Naturwissenschaften**, v. 85, n.4, p. 155- 163, 1998.

BURGER, H.G.; DUDLEY, E.C.; ROBERTSON, D. M.; DENNERSTEIN, L. Hormonal changes in the menopause transition. **Recent prog Horm res**, v. 57, p. 257-275, 2002.

CALIXTO, J. B. Medicamentos Fitoterápicos. In: YUNES, R. A. & CALIXTO, J. B. (Orgs.). **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos, p.297-315, 2001.

CAMPO, M. L. del.; SMEDLEY, S. R.; EISNER, T. Reproductive benefits derives from defensive plant alkaloid possession in the arctiid moth (*Utrtheisa ornatrix*). **Proceeding of the National Academy Sciences of the United States of America**, Nova Iorque, v. 102, p. 13508- 13512, 2005.

CARIELLO, N. F.; PIEGORSCH, W. W. The Ames test: The two-fold rule revisited. **Mutation Research.**, v. 369, p.23-31, 1996.

CÉSPEDES, R.; LACORTE, S.; RALDÚA, D.; GINEBREDÀ, A.; BARCELÓ, D.; PIÑA, B. Distribution of endocrine disruptors in the Llobregat River basin (Catalonia, NE Spain). **Chemosphere**, v. 61, n. 11, p. 1710 – 1719, 2005.

CÉSPEDES, R.; PETROVIC, M.; RALDUA, D.; SAURA, U.; PINA, B.; LACORTE, S.; VIANA, P.; BARCELO, D. Integrated procedure for determination of endocrinedisrupting activity in surface waters and sediments by use of the biological techniquerecombinant yeast assay and chemical analysis by LC–ESI-MS. **Anal Bioanal Chem**, v. 378, p. 697 – 708, 2004.

CHAN, G.; BOYLE, J.O.; YANG, E.K.; ZHANG, F.; SACKS, P.G.; SHAH, J.P.; EDELSTEIN, D.; SOSLOW, R.A.; KOKI, A.T; WOERNER, B.M.; MASFERRER, J.L.; DANNENBERG, A.J. Cyclooxygenase-2 expression is up-regulated in squamous cell carcinoma of the head and neck. **Cancer Res**, v.59, p.991-4,1999.

CHAN, T.A. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs, apoptosis, and colon-cancer chemoprevention. **Lancet Oncol**, v. 3, p. 166-74, 2002.

CHANDRASEKHARAN, N. V.; DAI, H.; ROOS, K.L: COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs cloning, structure and expression. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 99, p. 13926–13931, 2002.

CHEN, C.C, SUN, Y.T, CHEN, J.J, CHANG, Y. J: Tumor necrosis factor- α induced cyclooxygenase-2 expression via sequential activation of ceramide-dependent mitogenactivated protein kinases, and I κ B kinase 1/2 in human alveolar epithelial cells. **Mol Pharmacol**,v 59, p. 493–500, 2001.

CHOI, S. Y.; HA, T. Y.; AHN, J.Y.; KIM, S.R.; KANG, K.S.; HWANG, I. K.; KIM, S. Estrogenic activities of isoflavones and flavones end their structure-activity relationships. **Planta Med.**, v.74, p.25-32, 2008.

COLLINS, B. M.; MCLACHLAN, J. A.; ARNOLD, S. F. The estrogenic andantiestrogenic activities of phytochemicals with the human estrogen receptor expressed in yeast. **Steroids**, v. 62, n. 4, p. 365 - 372, 1997.

COS, P.; BRYNE, T. D.; APERS, S.; BERGHER, D.V. PIETERS, L.; CLIETINCK, A. J. Phytoestrogens: recent development. **Planta med**, v. 69, p. 589- 599, 2003.

CULVENOR, C.C.J. AND SMITH, L.W. AUST. The Alkaloids of *Crotalaria goreensis* Guill. et Perr.: 7 β -Hydroxy-1-methylene-8 β - and 7 β -Hydroxy-1-methylene-8 α -pyrrolizidine. **J. Chem**, v. 14, p. 284, 1961.

EMIM, J. A.; OLIVEIRA, A. B.; LAPA, A. J. Pharmacological evaluation of the anti-inflammatory activity of a citrus bioflavonoid, hesperidin, and the isoflavonoids, daurтин and claussequinone, in rats and mice.**J. Pharm. Pharmacol**, v. 46, p.118-122, 1994.

DA SILVA, J. O.; COPPEDE, J. S.; FERNANDES, V. C.; SANT'ANA, C. D.,; TICLI, F. K.,; MAZZI, M. V.; GIGLIO, J. R.; PEREIRA, P. S.; SOARES, A. M.; SAMPAIO,

S. V. Antihemorrhagic, antinucleolytic and other antiophidian properties of the aqueous extract from *Pentaclethra macroloba*. **J. Ethnopharmacol**, v. 100, p. 145 – 152, 2005.

DAI Y, WANG WH. Non-steroidal anti-inflammatory drugs in prevention of gastric cancer. **World J Gastroenterol**, v. 12, n. 12, p. 2884- 2889, 2006.

DAMIANI, D.; DAMIANI, D. Manejo farmacológico da baixa estatura: o papel dos inibidores da aromatase. **J. Pediatria**, v. 83, n.5, p. 172- 177, 2007.

DANNENBERG, A.J.; ALTORKI, N.K.; BOYLE, J.O.; DANG, C.; HOWE, LR.; WEKSLER, B.B.; SUBBARAMIAH, K. Cyclooxygenase-2: a pharmacological target for the prevention of cancer. **Lancet Oncol**, v. 2, p. 544–551, 2001.

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

DE JING, A.; PLAT, J.; MENSINK, R. Metabolic effects of plantsterols and stanols. **J. Nutr. Biochem**, v.14, p. 362-369, 2003.

DE SÁ FERREIRA, I. C. F.; FERRÃO VARGAS, V. M. Mutagenicity of medicinal plant extracts in Salmonella/microsome assay. **Phytotherapy Research**, v. 13, n. 5, 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, n. 1/2, p. 121–135, 2002.

DEMPKE, W.; RIE, C.; GROTHEY, A.; SCHMOLL, H.J: Cyclooxygenase-2: a novel target for cancer chemotherapy? **J Cancer Res Clin Oncol**, v. 127, p. 411–417, 2001.

DIAS, F. L.; TAKAHASHI, C. S.; SAKAMOTO-HOJO, E. T.; VICHNEWSKI, W.; SARTI, S. J. Genotoxicity of the natural Cercaricides “Sucupira” oil and eremanthine in mammalian cells in vitro and in vivo. **Environmental Molecular Mutagenesis**, v. 26, p. 338–344. 1995.

DOMINGO, D.; LÓPEZ-BREA, M. Plantas com acción antimicrobiana. **Revista española de Quimioterapia**, v. 16, n. 4, p. 385-393, 2003.

DUCKE, A. **As leguminosas da Amazônia brasileira**. Bolm. tec. do Inst. Agron. Norte v. 18, p. 4-248, 1949.

ELGORASHI, E. E.; TAYLOR, J. L. S.; MAES, A.; VAN SATDEN, J.; DE KIMPE, N.; VERSCHAEVE, L. Screening of medicinal plants used in South African traditional medicine for genotoxic effects. **Toxicology letters**, v. 143, n.2, p. 195- 207, 2003.

ELSOHLY, H. N.; JOSHI, A.S.; NIMROD, A.C. Antigiardial isoflavones from *Machaerium aristulatum*. **Planta Medica**, v. 65, n.5, p. 490, 1999.

EVERIST, S. L. **Poisonous Plants of Australia**. Angus and Robertson Publishers, p.284-295, 1974.

FARNSWORTH, N. R.; MORRIS, R. W. Higher plants – the sleeping giant of drug development. **Amer. J. Pharmacy**, v.147, p. 46-52, 1976.

FEARON, E. R.; VOLGESTEIN, B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. **Cell**, v. 61, p. 759- 767, 1990.

FERGUSON, L. R. Role of plant polyphenols in genomic stability. **Mutation Research**, v. 475, p. 89 – 111, 2001.

FERNANDEZ, M. P.; NOGUEROL, T. N.; LACORTE, S.; BUCHANAN, I.; PIÑA, B. oxicity identification fractionation of environmental estrogens in waste water and ludge using gas and liquid chromatography coupled to mass spectrometry and ecombinant yeast assay. **Anal Bioanal Chem**, v. 393, n. 3, p. 957 – 968, 2009.

FERRO, V.G. PADRÕES DE UTILIZAÇÃO DE *Crotalaria* spp. (LEGUMINOSAE, PAPILIONOIDEAE, CROTALARIEAE) POR LARVAS DE *Utetheisa ornatrix* (LEPIDOPTERA, ARCTIIDAE). **Tese de Mestrado**. Universidade Estadual de Campinas, 2001.

FLETCHER, M. T.; MCKENZIE, R. A.; BLANEY, B. J.; REICHMANN, K.G.; Pyrrolizidine Alkaloids in *Crotalaria* Taxa from Northern Australia: Risk to Grazing Livestock, **J. Agric. Food Chem**, v. 57, p.311–319, 2009.

FLORES, A. S. Taxonomia, números cromossômicos e química de espécies de *Crotalaria* L. (Leguminosae- Papilolionoideae) no Brasil. 196p. **Tese (Doutorado em Biologia Vegetal)** – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

FLORES, A.S., MIOTTO, S.T.S. Aspectos fitogeográficos das espécies de *Crotalaria* L. (Leguminosae, Faboideae) na Região Sul do Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v.19, n.245-249, São Paulo, 2005.

FLORES, A.S.; TOZZI, A.M.G.A.; TRIGO, J.R. Pyrrolizidine alkaloid profiles in *Crotalaria* species from Brazil: Chemotaxonomic significance. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.37, p.459-469, 2009.

FUU, P. P.; XIA, Q.; LIN, G.; CHOU, M. W: Pyrrolizidine alkaloids – genotoxicity, metabolism enzymes, metabolic activation, and mechanisms. **Drug Metab Rev**, v.36, n.1, p.1-55, 2004.

FUKUDA, Y.; SAKAI, K.; MATSUNAGA, S.; TOKUDA, H.; TANAKA, R. Cancer chemopreventive effect of orally administrated lupane-type triterpenoid on ultraviolet

light b induced photocarcinogenesis of hairless mouse. **Cancer Letters**, v. 240, p. 94-102, 2006.

GARCIA-REYERO, N.; PIÑA, B.; GRIMALT, J. O.; FERNÁNDEZ, P.; FONTS, R.; POLVILLO, O.; MARTRAT, B. Estrogenic activity in sediments from European mountain lakes. **Environmental and Science Technology**, v. 15, n. 39, p. 1427-1435, 2005.

GARNER, R.C.; MILLER, E.C.; MILLER, J.A. Liver microsomal metabolism of aflatoxin B1 to a reactive derivative toxic to *Salmonella typhimurium* TA1530, **Cancer Res**, v. 32, p. 2058–2066, 1972.

GHISELLI, G.; JARDIM, W. F. Interferentes endócrinos no ambiente. **Quim Nova**, v. 0, p.695-706, 2007.

GILHOLLY EM, ROSE DP. The association between a mutated ras gene and cyclooxygenase-2 expression in human breast cancer cell lines. **Int J Oncol**, v. 15, n. 2, p. 267–270, 1999.

GINZBARG, S. Plantas medicinales de los indios bribris y cabécar. **América Indígena**, v.37, p.367-398, 1977.

GLAZIER, M.G., BOWMAN, M.A. A review of the evidence for the use of phytoestrogen for traditional estrogen replacement therapy. **Archives of Internal Medicine**, v.16. p.1161– 1171, 2001.

GORDON, M.H. The development of oxidative rancidity in foods. In: POKORNY, J.; YANISHLIEVA, N.; GORDON, M. (Ed.). **Antioxidants in food: practical applications**. Cambridge: Woodhead Publishing, 2001. p.7-21.

GRIPPI, S. **Lixo, Reciclagem e sua história**. Rio de Janeiro: Interciência, 2001.

GREEN, L.C.; WAGNER, D.A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P.L.; WISHNOK, J.S.; TANNENBAUM, S.R. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N nitrates] in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, Bethesda, v. 26, p. 131-138, 1982.

GREEN, S.; CHAMBON, P. Chimeric receptors used to probe the DNA-binding domain of The estrogen and glucocorticoid receptors. **Cancer Research**, v. 15, n. 49, p. 2282-2285, 1989.

GRIFFIN, D. S.; SEGAL, H. J. Genotoxicity and cytotoxicity of selected pyrrolizidine alkaloids, a possible alkenal metabolite of the alkaloids and related alkenals. **Toxicol. Appl Pharmacol**, v. 86, p. 227- 234, 1986.

GRIFFITHS, A.J.F.; MILLER, J. H.; SUZUKI, D. T.; LEWONTIN, R. C.; GELBART, W. M.; WESSLER, S. R. **Introdução à Genética**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 764p, 2006.

GURIB- FAKIM, A. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular Aspects of Medicine**, v.27, p. 1 – 93, 2006.

GUSTAFSSON, J.A. Estrogen receptor β : a new dimension in estrogen mechanism of action. **J Endocrinol**, v.163, p. 379 - 383, 1999.

HAN, D. H.; DENISON, M. S.; TACHIBANA, H.; YAMADA, K. Relationship between estrogen receptor-binding and estrogenic activities of environmental estrogens and suppression by flavonoids. **Biosci Biotechnol Biochem**, v. 66, n. 7, p. 1479 – 1487, 2002.

HARLOW, B. L.; SIGNORELLO, L. B. Factors associated with early menopause. **Maturitas**, v. 35, n. 1, p. 3–9. 2000.

HAYS, J.; OCKENE, J. K.; BRUNNER, R. L.; KOTCHEN, J. M.; MANSON, J. E.; PATTERSON, R. E. Women's health initiative investigators effects of estrogen plus progestin on health related quality of life. **N. Engl. J. Med.**, v. 348, p. 1835–1837. May 2003.

HAZEN, M. J.; GUTIÉRREZ-GONZÁLES, M.G. UV-mediated toxic bioactivity of harmine in the meristematic cells of *Allium cepa*. **Mutagenesis**, v.3, p. 333-337, 1988.

HIGASHI, Y.; KANEKURA, T.; KANZAKI, T. Enhanced expression of cyclooxygenase (COX-2) in human skin epidermal cancer cells: evidence for growth suppression by inhibiting COX-2 expression. **Int J Cancer**, v. 86, p. 667-71, 2000.

HONG, S. C.; YOO, S. W.; CHO, G. J.; KIM, T.; HUR, J. Y.; PARK, Y. K, LEE, K. W, KIM, S. H. Correlation between estrogens and serum adipocytokines in premenopausal and postmenopausal women. **Menopause**, v.14, n.5, p.835-40, 2007.

HWANG, D.; SCOLLARD, D.; BYRN, J.; LEVINE, E. Expression of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in human breast cancer. **J Natl Cancer Invest**, v.90, p.455-60, 1998.

JAIN, S. K.; BORTHAKUR, S. K. Ethnobotany of the Mikers of India. **Economic Botany**, v. 34, n. 3, p. 264 – 272, 1980.

JIMENÉZ, M. R.; SANCHÉS, J. C.; MOHAMED ANALLA, M.; ANDRES, A. M. M.; MORAGA, A. A. Genotoxicity and antigenotoxicity of some traditional medicinal herbs. **Mut. Res/ Gen. Toxicol. Env. Mut**, v. 585, p. 147- 155, 2005.

JOLY, L. G.; GUERRA, S.; SEPTIMO, R.; SOLIS, P. N.; CORREA, M.; GUPTA, M.; LEVY, S.; SANDBERG, F. J. Ethnobotanical inventory of medicinal plants used by the Guaymi Indians in western Panama. Part I. **Ethnopharmacol**, v. 20, p. 145-171, 1987.

JOO, Y.E.; KIM, H.S.; MIN, S.W.; LEE, W.S.; PARK, C.H.; PARK, C.S.; CHOI, S.K.; REW, J.S.; KIM, S.J. Expression of cyclooxygenase-2 protein in colorectal carcinomas. **Int J Gastrointest Cancer**, v.31, p.147-54, 2002.

JURCEK, O; IKONEN, S.; BURICOV, L.; WIMMEROV, M.; WIMMER, Z.; DRASAR, P. Succinobucol's new coat – conjugation with steroids to alter drug effect and bioavailability. **Molecules**, v.6, p.9404–9420, 2011.

KAMBOJ, A.; SALUJA, A.K. Isolation of stigmasterol and β sitosterol from petroleum ether extract of aerial parts of *Ageratum Conyzoides*. **Int. J. Pharm. Pharma Sci**, p. 94- 96, 2011.

KENDALL, B.; ESRON, R. Exercise-induced muscle damage and the potential protective role of estrogen. **Sports Med**, v. 32, n. 2, p.103-23, 2002.

KLEIN, C. B, KING, A. A.Genistein genotoxicity: critical considerations of in vitro exposure dose. **Toxicol Appl Pharmacol** , v. 224, p.1–11, 2007.

KIN, B. H.; KIM, C. I.; CHANG, H. S.; CHOE, M. S.; JUNG, H. R.; KIM, D. Y.; PARK, C. H. Cyclooxygenase-2 overexpression in chronic inflammation associated with benign prostatic hyperplasia: Is it related to apoptosis and angiogenesis of prostate cancer?. **Korean Journal of Urology**, v.52, n. 4, p. 253 – 259, 2011.

KIRSCHENBAUM A, KLAUSNER AP, LEE R, UNGER P, YAO S, LIU XH, Expression of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in the human prostate. **Urology**, v. 56, p. 671-676, 2000.

KO, H.; WENG, J.; TSAO, L.; YEN, M.; WANG, J.; LIN, C. A anti-inflammatory flavonoids and pterocarpanoid from *Crotalaria pallida* and *C. Assamica*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 14, p. 1011- 1014, 2004.

KUROSAWA, K.; OLLIS, W. D.; SUTHERLAND, I. O.; GOTTLIEB, O. R.; OLIVEIRA, A. B. de. Mucronulatol, mucroquinone and mucronucarpan, isoflavonoids from *Machaerium mucronulatum* and *Machaerium villosum*. **Phytochemistry**, v.17,n. 8, p.1405-1411, 1978.

LANE, T. E.; WUU- HSIEH, B. A.; HOWARD, D. H. Gamma interferon cooperates with lipopolysaccharide to active mouse splenic macrophages to an antihistoplasma state. **Infection Immun**, v. 61, n.4, p. 1468 – 1473, 1993.

LE BAIL, J.C.; VARNAT, F.; NICOLAS, J. C.; HABRIOUX, G. Estrogenic and sntiproliferative activities on MCF-7 human breast cancer cells by flavonoids. **Cancer letters**, v. 130, p. 209- 216, 1998.

LEWIS, G. P.; SCHRIRE, B. D.; MACKINDER, B. A.; LOCK, J. M. **Legumes of the world**. Kew: Royal Botanic Gardens, 577p, 2005.

LIM, J. C.; PARK, J. H.; BUDESINSKY, M.; KASAL, A.; HAN, Y. H.; KOO, B. S.; LEE, S. I.; LEE, D. U. Antimutagenic constituents from the thorns of *Gleditsia sinensis*. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v.53, n.5, p. 561-564. 2005.

LINSEISEN, J.; PILLER, R.; HERMANN, S, CHANG-CLAUDE, J .Dietary phytoestrogen intake and premenopausal breast cancer risk in a German case-control study. **Int J Cancer**, v. 110, p. 284–290, 2004.

LOH, D. S.; ER, H. M.; CHEN, Y. S. Mutagenic and antimutagenic activities of aqueous and methanol extracts of *Euphorbia hirta*. **J Ethnopharmacol**, v. 126, n. 3, p. 406 - 414, 2009.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Vol.1. Plantarum, Nova Odessa, 352p, 1992.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Vol. 2.Plantarum, Nova Odessa, 352p, 1998.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas Medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Plantas Medicinais. Nova Odessa, SP, 2002.

LOUREIRO, A.P.M.; DI MASSIO, P.; MEDEIROS, M.H.G. Formação de adutos exocíclicos com bases de DNA: Implicações em mutagênese e carcinogênese. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 5, p. 777-793, 2002.

LOZANO, P.; KLITGAARD, B. B. The genus *Machaerium* (Leguminosae: Papilionoideae: Dalbergieae)in Ecuador. **Brittonia**, v. 58, n. 2, p. 124- 150, 2006.

MABBERLEY, D. J. **The plant book**. 2.ed. Cambridge: Cambridge University Press, p. 874, 1997.

MABRY, THOMAS, M.B. T.J.; MARKHAM, K.R.; **The systematic identification of Flavonoids**. New York: Springer-verlag, 1970.354p.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA JUNIOR, V. F.; GRYNBERG, N. F.; ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: A necessidade de estudos multidisciplinares. **Química nova**, v. 25, n.3, p. 429- 438, 2002.

MADAAN, S.; ABEL, P. D.; CHAUDHARY, K. S.; HEWITT, R.; STOTT, M.A.; STAMP, G.W. Cytoplasmic induction and over-expression of cyclooxygenase- 2 in human prostate cancer: implications for prevention and treatment. **BJU Int**, v. 86, p. 736-741, 2000.

MADLE, E.; OBE, G.; HANSEN, J.; RISTOW, H. Harman and norharmane: induction of sister-chromatid exchanges in human peripheral lymphocytes in vitro and interaction with isolated DNA, **Mutation Research**, v. 90, p. 433-442, 1981.

MAGALHÃES, A. H.; ARNDT, V. H.; OLLIS, W. D.; EYTON, W. B.; GOTTLIEB, O. R.; MAGALHAES, T. M. **Phytochemistry**, v.5, p.1327-1330, 1966.

MAGGE, P. J.; ROWLAND, I. R. Phyto-oestrogens, their mechanism of action: current evidence for a role in breast and prostate cancer. **British Journal of Nutrition**, v. 91, n. 4, p. 513-531, 2004.

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

MARQUES, R. C. P.; MEDEIROS, S. R. B.; DIAS, C. S., BARBOSA-FILHO, J. M.; AGNEZ-LIMA, LF., 2003. Evaluation of the mutagenic potential of yangambin and the hydroalcoholic extract of *Ocotea duckei* by Ames test. **Mutation Research**, v. 536, n. 1-2, p. 117-120, 2003.

MARTINS, E. R.; CASTRO, D. M. CASTELLANI, D. C. ;DIAS,J. E. **Plantas medicinais**. Editora UFV. Universidade de Viçosa, MG, Brasil, p.220, 2000.

MARTINS, M. V. **Leguminosas arbustivas e arbóreas de fragmentos florestais remanescentes no noroeste paulista, Brasil**. 2009. 173 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2009.

MATEUCA, R.; LOMBAERT, N.; AKA, P. V.; DECORDER, I.; KIRSCHVOLDERS, M. Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring. **Biochimie**, v. 88, n. 11, p. 1515-1531, 2006.

MATVIENKO, O. A.; LEWIS, M. S.; ARNDT, B.; RAINWATER, J. S.; ALEKEL, D. L. A single daily dose of soybean phytoosterols in ground beef decreases serum total cholesterol and LDL cholesterol in young, mildly hypercholesterolemic men. **The American Journal of Clinical Nutrition**, 76, p. 57-64. 2002.

MAYES, J. S.; WATSON, G. H. Direct effects of sex steroid hormones on adipose tissues and obesity. **Obes Ver**, v.5, n 4, p.97-216, 2004.

MCGEORGE, L. S.; LOUIS, J. B.; ALTRERHOLT, T. B.; MCGARRITY, G. J. Mutagenicity analysis of industrial effluents: Results and consideration for integration into water pollution control programs. In *Short Term Bioassays in the Analysis of Complex Environmental Mixtures*; WATERS, M. D., CLAXTON, L., LEWTAS, J., NESNOW, S., SANDHU, S. S., STRAUSS, G., EDS.; **PLENUM**: New York, NY, USA, v 4, p. 247–267, 1985.

MEDINA, J. C. **Plantas Fibrosas da Flora Mundial**. São Paulo: Indústria Gráfica Siqueira. 913p, 1959.

MENDONÇA, V. L. M. Estudo Farmacológico e Toxicológico de *Alpinia speciosa* Schum. **Dissertação** (Mestrado em Química Orgânica), Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Universidade Federal do Ceará, 56p.1989.

MESELSON, M.; RUSSEL, K. Comparisons of carcinogenic and mutagenic potency. In: H.H. HIAT, J. D. WATSPM, J. A. WINSTEN (ed). **Origins of Human Cancer**, New York, Book C.: Cold Spring Harbor Laboratory, p. 1473- 1481, 1977.

MICSICEK, R. J. Interaction of naturally occurring nonsteroidal estrogens with expressed recombinant human estrogen receptor. **J Steroid Biochem Mol**, v. 49, p. 153 - 160, 1994.

MICSICEK, R. J. Commonly occurring plant flavonoids have estrogenic activity. **Mol Pharmacol**, v. 44, p. 37 - 43, 1993.

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

MONTANARI, C .A.; BOLZANI, V. S. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 24, n. 1, p. 105-111, 2001.

MORTELMANS, K.; ZEIGER, E. E. The Ames *Salmonella*/ micrososome mutagenicity assay. **Mutation Research**, 455p, p. 29-60, 2000.

MURAKAMI, M.; AMBE, T.; SHIMBARA, S.; KUDO, I. Functional coupling between various phospholipase A and cyclooxygenases in immediate and delayed prostanoid biosynthetic pathways. **J. Biol. Chem**, v. 274, p. 7908- 8916, 1999.

MURATA, H.; KAWANO, S.; TSUJI, S.; TSUJI, M.; SAWAOKA, H.; KIMURA, Y.; SHIOZAKI, H.; HORI, M. Cyclooxygenase-2 overexpression enhances lymphatic invasion and metastasis in human gastric carcinoma. **Am J Gastroenterol**, v. 94, p.451-5, 1999

MYERS, L. N.; ADAMS, N.; KIER, T. K.; RAO, B.; SHAW, B.; WILLIAMS, L. Microcomputer software for data management and statistical analyses of the Ames/*Salmonella* test. In D. Krewski (ed.), **Statistical Methods in Toxicological Research**. Gordon and Breach, New York, NY.USA, p. 265-27, 1991.

NAEYER, A.; VANDEN BERGHE, W.; POCOCK, V.; MILLIGAN, S.; HAEGEMAN, G.; DE KEUKELEIRE, D. Estrogenic and anticarcinogenic properties of kurarinone, a lavandulyl flavanone from the roots of *Sophora flavescens*. **J Nat Prod**, v. 67, n. 11, p. 1829 - 1832, 2004.

NAKAYASY, M.; NAKASATO, F.; SAKAMOTO, H.; TERADA, M.; SUGIMURA, T. Mutagenic activity of norharman and Harman in Chinese lung cells in assay with diphtheria toxin resistance as a marker, **Cancer Lett**, v. 17, p.249-255, 1983.

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.

NARANDER, T.; SCWETA; TANVIR, K.; SRINIVASA RAO, M.; SRINVASTA, K.; PURI, S. K. Prenylated chalcones isolated from *Crotalaria* genus inhibits in vitro growth of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, Oxford, v. 15, p. 2453 – 2455, 2005.

NEWILL, H.; LOSKE, R.; WAGNER, J.; JOHANNES, C.; LORENZ, R.; LEHMANN, L. Oxidation products of stigmasterol interfere with the action of the female sex hormone 17 β - estradiol in culture human breast and endometrium cell lines. **Mol. Nutr. Food Res**, v. 51, p. 888- 898, 2007.

NOGUEROL, T. N.; BORONAT, S.; CASADO, M.; RALDÚA, D.; BARCELÓ, D.; PIÑA, B. Evaluating the interactions of vertebrate receptors with persistent pollutants and antifouling pesticides using recombinant yeast assays. **Anal Bioanal Chem**, v. 385, n. 6, p. 1012-1019, 2006.

NORMÉN, A. L.; BRANTS, H. A. M.; VOORRIPS, L. E.; ANDERSSON, H. A.; BRANDT, P. A.; GOLDBOHRM, R. A. Plant sterol intakes and colorectal cancer risk in the Netherlands Cohort Study on Diet and Cancer. **The American Journal of Clinical Nutrition**, 74, p. 141-148. 2001.

NUNES, L. G. N.; GONTIJO, D. C.; SOUZA, C. J. A.; FIETTO, L. G.; CARVALHO, A. F.; LEITE, J. P. V. The mutagenic, DNA-damaging and antioxidative properties of bark and leaf extracts from *Coutarea hexandra* (Jacq.) K. Schum. **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 3, n. 3, p. 297– 230, 2012.

OGAWA, T.; OHTA, K.; IIJIMA, T.; SUZUKI, T.; OHTA, S.; ENDO, Y. Synthesis and biological evaluation of *p*-carborane bisphenols and their derivatives: structureactivity relationship for estrogenic activity. **Bioorg Med Chem**, v. 17, n. 3, p. 1109 – 1117, 2009.

OLIVEIRA, V. M.; ALDRIHI, J. M.; RINALDI, J. R. Quimioprevenção do câncer de mama. **Rev Assoc Med Bras.**, v. 52, n. 5, p. 453- 459, 2006.

OLLIS, W. D.; REDMAN, B. T.; ROBERTS, R. J.; SUTHERLAND, I. O ; GOTTLIEB, O R.; MAGALHAES, M. T. Neoflavonoids and the cinnamylphenol kuhlmannistyrene from *Machaerium kuhlmannii* and *Machaerium nictitans*. **Phytochemistry**, v.17, n. 8, p.1383-1388, 1978a.

OLLIS, W. D.; SUTHERLAND, I. O; ALVES, H. M.; GOTTLIEB, O. R. Durtin, an isoflavan from *Machaerium opacum*. **Phytochemistry**, v.17, n.8, p.1401-1403, 1978b.

OSBORNE, C.K. Steroid hormone receptors in breast cancer management. **Breast Cancer Res Treat**, v. 51, p. 227- 238, 1998.

OSBORNE, C; K.; ZHAO, H.; FUQUA, S. A. W. Selective estrogen receptor modulators: Structure, function, and clinical use. **Journal of Clinical Oncology**, v. 17, n. 17, p. 3172- 3186, 2000.

PATRICK, G. L.; *An Introduction to Medicinal Chemistry*; Oxford University Press, Grã-Bretanha; 1995.

PELEGRINI, P. B.; FARIAS, L. R.; SAUDE, A. C. M.; COSTA, F. C.; BLOCH, C.; SILVA, L. P.; OLIVEIRA, A. S.; GOMES, E. M.; SALES, M. P.; FRANCO, O. L. A novel antimicrobial peptide from *Crotalaria pallida* seeds with activity against human and phytopathogens. **Curr Microbiol**, v. 59, p. 400- 104, 2009.

PEPPELENBOSCH, M.P.; TERTOOLEN, L.G.; HAGE, W.J.; DE LAAT, S.W: Epidermal growth factor-induced actin remodeling is regulated by 5-lipoxygenase and cyclooxygenaseproducts. **Cell**, v.74, p.565–575, 1993.

PÉREZ- ARBELÁEZ, E. **Plantas útiles de Colombia**. Editorial Victor Hugo, 14ª edição, Bogotá, 1807.

PERSOON, C. H. **Synopsis plantarum seu enchiridium botanicum**. Treutel & Wurtz, Paris. v.2, 1807.

PETZINGER, E. Pyrrolizidine alkaloids and seneciosis in farm animals.Part 1: Occurrence, chemistry and toxicology. **Tierärztliche Praxis Großtiere**, V. 4, P. 221-230, 2011.

PIERSEN, C. E. Phytoestrogens in botanical dietary supplements: implications for cancer. **Integ Cancer Ther**, v. 2, n. 2, p. 120 - 138, 2003.

PINTO, B.; BERTOLI, A.; NOCCIOLI, C.; GARRITANO, S.; REALI, D.; PISTELLI, L. Estradiol-antagonistic activity of phenolic compounds from leguminous plants. **Phytother Res**, v. 22, n. 3, p. 362-366, 2008.

POLHILL, R. M. Dalbergieae Bronn ex DC. In *Advances in legume systematics*. (R.M. Polhill & P.H. Raven, eds.). Royal Botanic Gardens, Kew, v.1, p.1-425, 1981.

POLHILL, R. M. *Crotalaria* in Africa and Madagascar. A.A. Balkema Publishers, Rotterdam. p 3 - 7, 93 – 330, 1982.

POTT, A.; POTT, V. J. **Plantas do Pantanal**. Brasília: Embrapa, 320p, 1994.

POTT, A.; POTT, V. J. **Plantas do pantanal**. 2. ed. Brasília, DF: Embrapa. 320 p, 2004.

PRISTA, L. Nogueira. **Tecnologia farmacêutica**. Colaboração de A. Correia Alves; Rui Morgado. 4. ed. Lisboa: Fundacao Calouste Gulbenkian. v.3, 1995.

PUGH, S.; THOMAS, G. A. Patients with adenomatous polyps and carcinomas have increased colonic mucosal prostaglandin E₂. **Gut**, v.35, p. 675- 678, 1994.

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.

QURISHI, Y.; HAMID, A.; MAJEED, R.; HUSSAIN, A.; QAZI, A. K.; AHMED, M.; ZARGAR, M. A.; SINGH, S. K.; SAXENA, A. K. Interaction of natural products with cell survival and signaling pathways in the biochemical elucidation of drugs target in câncer. **Future Oncology**, v. 8, p. 1007- 1021, 2011.

RASCHKE, W. C.; BAIRD, S.; RALPH, P.; NAKOINZ, I. Functional macrophage cell lines transformed by Abelson leukemia virus. **Cell**, v. 15, n. 1, p. 261- 267, 1978.

RDC n° 48, de 16 de março de 2004. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. Disponível em: <[http:// www.anvisa.gov.br](http://www.anvisa.gov.br)>. Acesso em: 22 jan. 2013.

REILLY, T.P.; BELLEVUE, F.H.; WOSTER, P.M.; SVENSSON, C.K. Comparison of the in Vitro Cytotoxicity of Hydroxylamine Metabolites of Sulfamethoxazole and Dapsone. **Biochemical Pharmacology**, New York, v. 55, p. 803-810, 1998.

RESENSE, F. A.; BARCALA, C. A. M. A.; FARIA, M. C. S.; KATO, F. H.; CUNHA, W. R.; TAVARES, D. C. Antimutagenicity of ursolic acid and oleanolic acid against doxorubicin- induced clastogenesis in Balb/c mice. **Life Science**, v. 79, n. 13, p. 1268-1273, 2006.

RESENDE, F.A.; VILEGAS, W.; DOS SANTOS, L.C.; VARANDA, E.A. Mutagenicity of flavonoids assayed by bacterial reverse mutation (Ames) Test. **Molecules**, v. 17, p. 5255-5268, 2012.

REZENDE, J. R.; RODRIGUES, S. B.; JABOR, I. A. S.; PAMPHILE, J. A.; ROCHA, C. L. M. S. C. Efeito antimutagênico do látex de *Euphorbia tirucalli* no sistema metionina em *Aspergillus nidulans*. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, 26(4), p. 481-484. 2004.

RICE, S.; AMON, A.; WHITEHEAD, S. A. Ethanolic extracts of black cohosh (*Actaea racemosa*) inhibit growth and oestradiol synthesis from oestrone sulphate in breast cancer cells. **Maturitas**, v. 56, n. 4, p. 359 – 367, 2007.

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

RIGAS, B.; GOLDMAN, I. S.; LEVINE, L. Altered eicosanoid levels in human colon cancer. **J. Lab. Clin. Med**, v. 122, p. 518-523, 1993.

ROSENBERG, R.S.; JENKINS, D. J. A.; DIAMANDIS, E. P. Steroid hormone activity of flavonoids and related compounds. **Breast cancer Res Treat**, v. 62, p. 35- 49, 2000.

RUDD, V. E. The genus *Machaerium* (Leguminosae) in Mexico. **Bol. Soc. Bot. Mexico**, v.37, p. 119-146, 1977.

RYMER, J.; WILSON, R.; BALLARD, K. Making decisions about hormone replacement therapy. **British Medical Journal**, v.326, p.322–326, 2003.

SANTAMARTA, J. A ameaça dos disruptores endócrinos. **Agroecol Des Rur Sust**, v.2, n. 3, 2001.

SANTEN, R. J.; ALLRED, D. C, ARDOIN, S. P.; ARCHER, D.F.; BOYD, N.; BRAUNSTEIN, G. D.; BURGER, H. G, COLDITZ, G. A, DAVIS, S. R.; GAMBACCIANI, M.; GOWER, B. S.; HENDERSON, V. W.; KARAS, R. H, KLEEREKOPER, M.; LOBO, R. A.; MANSON, J. E.; MARSDEN, J.; MARTIN, K. A.; MARTIN, L.; PINKERTON, J. V.; RUBINOW, D. R.; THIBOUTOT, D. M.; UTIAN, W. H. Postmenopausal hormone therapy: an Endocrine Society scientific statement. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 95, p. 1-66, 2010.

SANTOS, A. R. S.; NIERO, R.; FILHO, V. C.; YUNES, R. A.; PIZZOLATTI, M. G.; MONACHE, F. D.; CALIXTO, J. B. Antinociceptive properties of steroids isolated from *Phyllanthus corcovadensis* in mice. **Planta Medica**, v. 61, p. 329-332. 1995.

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

SASAKI, Y.F.; YAMADA, H.; SHIMOI, K.; KINAE, N.; TOMITA, I.; MATSUMURA, H.; OHTA, T.; SJIRASU, Y. Enhancing effects of heterocyclic amines and -carbolines on the induction of chromosome aberrations in culture mammalian cells. **Mutation Research**, v. 269, p. 79-95, 1992.

SCARTOZZI M, GALIZIA E, FREDDARI F, BERARDI R, CELLERINO R, CASCINU S. Molecular biology of sporadic gastric cancer: prognostic indicators and novel therapeutic approaches. **Cancer Treat Rev**, v. 30, p. 451- 459, 2004.

SCHMALSTING, J. G. Light perception for sun-tracking is on the lamina in *Crotalaria pallida* (Fabaceae). **American Journal of Botany**, v. 84, n. 3, p. 308 – 314, 1997.

SCHOENTAL, R. Chemical structure and pathological effects of pyrrolizidine alkaloids. **Israel J Med Sci**, v.4, p.1133–1145, 1968.

SCHOENTAL, R. Health hazards of pyrrolizidine alkaloids: A short review. **Toxicol Lett**, v.10, p.323–326, 1982.

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

SEONG, H. J.; KOH, S. B.; KIM, T. S.; PARK, H. W.; PARK, C. G.; KIM, J. S.; KANG, M. H. Composition for preventing and treating large intestine cancer without side effects comprising extract of *Crotalaria sessiflora* L. with antioxidizing, anticancer and immune function-promoting activities KR 2997036099- A. 26 fev, 2007. 02 abr. 2007. **Univ Hoseo Academic Coop Found**, (Uyho), 2007.

SHEN, P.; GUO, B. L.; GONG, Y.; HONG, D. Y.; HONG, Y.; YONG, E. L. Taxonomic, genetic, chemical and estrogenic characteristics of *Epimedium* species. **Phytochem**, v. 68, n. 10, p. 1448-1458, 2007.

SILVA JÚNIOR, A.A. **Essentia herba – Plantas bioativas**. Florianópolis, SC, Epagri, 2003.

SIMÕES, C. M. O.; SCKENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis:Universidade/UFRGS/UFSC. 1999.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P. DE.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5ed. UFRGS, Porto Alegre/Florianópolis, 2004, 1102p.

SMITH, W.L, LANGENBACH, R: Why there are two cyclooxygenase isozymes. **J Clin Invest**, v. 107, p. 1491–1495, 2001.

SOSLOW RA, DANNENBERG AJ, RUSH D, WOERNER BM, NASIR KHAN K, MASFERRER J, *et al.* COX-2 is expressed in human pulmonary, colonic, and mammary tumors. **Cancer** 2000;89(12):2637–45.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II**. Nova Odessa: Instituto Platarum, 640 p, 2005.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de angiosperma da flora brasileira, baseada em APGII. 2.ed.** Nova Odessa: Instituto Plantarum, 703p, 2008.

STURDEE, D. W.; PINES, A.; International Menopause Society Writing Group. Updated IMS recommendations on postmenopausal hormone therapy and preventive strategies for midlife health. **Climacteric**, v. 14, p. 302- 320, 2011.

ŠUSTEKOVÁ, J.; DRASAR, P.; ŠAMAN, D.; WIMMER, Z. Stigmasterol-based novel low molecular weight/mass organic gelators. **Molecules**, v.16, p.9357–67, 2011

SVOBODOVÁ, H.; NONAPPA, WIMMER, Z.; KOLEHMAINEN, E. Design, synthesis and stimuli responsive gelation of novel stigmasterol-amino acid conjugates. **J Colloid Interf Sci**, v.361, p.587–593, 2011.

TAKEMURA, A.; KIM, B. H. Effects of estradiol 17- β treatment on in vitro and in vivo synthesis of two distinct vitellogenins in tilapia. **Comp. Bioch. And Physiology**, v. 129 (part A), p. 641- 681, 2001.

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

TOLEDO, A.C.; HIRATA, L. L.; BUFFON, M. C. M.; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G. Fitoterápicos: uma abordagem farmacotécnica. **Revista Lecta**, v. 21, n. 1/2, p. 7-13, 2003.

TOKARNIA, C. H.; DÖBEREINER, J.; PEIXOTO, P. V. **Plantas Tóxicas do Brasil.** Editora Helianthus, Rio de Janeiro, 2000.

TSUJII, M.; KAWANO, S.; DUBOIS, R.N. Cyclooxygenase-2 expression in human colon cancer cells increases metastatic potential. **Proc Natl Sci USA**, v. 94, p. 3336-3340, 1997.

TSUJII, M.; KAWANO, S.; SAWAOKA, H.; HORI, M.; DUBOIS, R.N. Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. **Cell**, v.93, p.705-716, 1998.

UMBUZEIRO, G. A.; VARGAS, V. M. F. **Teste de mutagenicidade com *Salmonella typhimurium* (Teste de Ames) como indicador de carcinogenicidade em potencial para mamíferos.** In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. Mutagênese Ambiental. Canoas: Edi. Ulbra, 355p, 2003.

VALERIE, B. L.; LEITMAN, D.; JAFFE, R. B. Selective Estrogen Receptor Modulators in Reproductive Medicine and Biology. **Obstetrical & Gynecological**, v. 55, n. 7, p. 21-47, 2000.

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura ? **Quím. Nova**, São Paulo, v. 28, n. 3, p.519-528, 2005.

VIEIRA, L. H. L.; SOARES JÚNIOR, J. M.; NUNES, M. G.; SIMÕES, R. S.; KAARI, C.; HAIDAR, M. A.; BARACAT, E. C. Efeitos da isoflavona e dos estrogênios conjugados equinos sobre a qualidade de vida na pós-menopausa. **Rev Bras Ginecol Obstet**, v. 29, n. 5, p. 248-252, 2007.

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

VIRK-BAKER, M. K.; NAGY, T. R.; BARNES, S. Role of phytoestrogens in cancer therapy. **Planta Med**, v. 76, n. 11, p. 1132 – 1142, 2010.

WANG, H.-L.; LI, Q.-L.; YING, J.; Luo, Z.-F.; WANG, Y.-Z. The protective effect and mechanism of soybean oil and its extracts in DNA damage in human ECV304 cells exposed to UV-C. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1626, p. 1626, 19-24, 2003.

WARD, H. A.; KUHNLE, G. G. Phytoestrogen consumption and association with breast, prostate and colorectal cancer in EPIC Norfolk. **Arch Biochem Bioph**, v. 501, n.1, p. 170 – 175, 2010.

WEISBURGER, J. H.; HARA, Y.; SOLAN, L.; LUO, F. Q.; PITTMAN, B.; ZANG, E. Tea polyphenols as inhibitors of mutagenicity of major classes of carcinogens. **Mutation research**, v. 371, n. 1-2, p.57-63, 1996.

WENG, 2003). WENG, J.R.; TSAO, L.T.; YEN, M.H.; WANG, J.P.; LIN, C.N. Anti-inflammatory Constituents and New Pterocarpanoid of *Crotalaria pallida*. **Journal of Natural Products**, v. 66, p. 404-407, 2003

WILGUS, T.A.; ROSS, M.S.; PARRETT, M.L.; OBERYSZYN, T.M. Topical application of a selective cyclooxygenase inhibitor suppresses UVB mediated cutaneous inflammation. **Prostaglandins Other Lipid Mediat**, v.62, n.4, p.367-84, 2000.

WILLIAMS, C. S.; LUONGO, C.; RADHIKA, A.; ZHANG, T.; LAMPS, L. W.; NANNEY, L. B.; BEAUCHAMP, R. D.; DUBOIS, R. N. Elevated cyclooxygenase-2 levels in min mouse adenomas. **Gastroenterology**, v. 111, p; 1134- 1140, 1996.

YOSHIMURA, R.; SANO, H.; MASUDA, C.; KAWAMURA, M.; TSUBOUCHI, Y.; CHARGUI, J. Expression of cyclooxygenase-2 in prostate carcinoma. **Cancer**, v. 89, p. 589-96, 2000.

YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. **Plantas Medicinais sob a ótica da Química Medicinal Moderna**. Chapecó, Argus. 500p, 2001.

YUNES, R. A.; PEDROSA, R.C.; CECHINEL FILHO, V. Fármacos. 2 e fitoterápicos: a necessidade de desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Química nova**, v.24, n. 1, p. 147- 152, 2001.

ZACHAREWSKI, T. Identification and assessment of endocrine disruptors: limitations of *in vivo* and *in vitro* assays. **Environ Health Perspect**, v. 106, n. 2, p. 577-582, 1998.

ZAND, R.S.; JENKINS, D.J.; DIAMANDIS, E.P. Steroid hormone activity of flavonoids and related compounds. **Breast Cancer Res Treat**, v. 62, n. 1, p. 35 – 49, 2000.

ZHANG, F.; SUBBARAMAIAH, K.; ALTORKI, N.; DANNENBERG, A.J: Dihydroxy bile acids activate the transcription of cyclooxygenase-2. **J Biol Chem**, v.273, p. 2424–2428, 1998.

ANEXO I – Meios e soluções utilizadas para o ensaio RYA.**- Meio YPD**

Extrato levedura.....	10g
Peptona.....	20g
Água MiliQ.....	900 mL
Glicose 40%.....	50mL

- Ajustar o pH para 5,5 com HCl antes de completar o volume com água (1 L no final).

Autoclavar (121°C, 15 minutos).

Para **meio sólido** acrescentar ágar (20 g/L)

- Meio Mínimo (MM)

Yeast Nitrogen Base.....	1,7 g
Sulfato de Amônio (NH ₄) ₂ SO ₄	5 g
Água MiliQ.....	1,0 L

Adicionar (soluções preparadas e autoclavadas separadamente):

Glicose 40%.....	50 mL
Metionina 10%.....	1 mL
Histidina 10%.....	1 mL

Ajustar o pH para 5,5 com HCl antes de completar o volume com água (1 L no final).

Autoclavar (121°C, 15 minutos).

Para **meio sólido** acrescentar ágar (20 g/L)

-Metionina 10%

Metionina.....	0,1g
Água MiliQ.....	1mL

-Histidina 10%:

Histidina.....	0,1g
Água MiliQ.....	1mL

-MuGal

Tampão Z.....	100 mL
Triton X – 100 10%.....	1 mL
SDS 10%.....	1 mL
Mercaptoetanol (Usar na capela).....	70 uL
MuGal.....	21 mg

-Triton X – 100 10% (líquido):

Triton X – 100.....	0,1 mL
Água MiliQ.....	0,9 mL

-SDS 10% (em pó):

SDS.....	100 mg
----------	--------

Água MiliQ.....1 mL

-Tampão Z

Na₂PO₄ – 60 mM.....8,52 g
NaH₂PO₄ – 40 mM.....5,52 g
KCl – 10 mM.....0,75 g
MgSO₄ 7 H₂O – 1 mM.....1 mL
Água MiliQ.....completar para 1 L

Ajustar o pH para 7,0 (se precisar) com HCl antes de completar o volume de água.
Não precisa autoclavar,

-MgSO₄ 7 H₂O – 1 mM

MgSO₄ 7 H₂O – 1 mM.....12,32 g
Água MiliQ.....50 mL