

**Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
Câmpus de Araraquara  
Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia**

**Lívia Gregghi Espanha**

**Avaliação da mutagenicidade, antimutagenicidade e  
estrogenicidade de *Byrsonima* spp.**

**Araraquara-SP  
2014**

**Lívia Gregghi Espanha**

**Avaliação da mutagenicidade, antimutagenicidade e  
estrogenicidade de *Byrsonima* spp.**

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 -SP  
2014**

**Ficha Catalográfica**

Elaborada Por Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
UNESP – Campus de Araraquara

- E77a** Espanha, Livia Greghi  
Avaliação da mutagenicidade, antimutagenicidade e estroginicidade de *Byrsonima spp.* / Livia Greghi Espanha. -- Araraquara, 2014.  
136 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. Área de De concentração Mutagênese.  
Orientadora: Eliana Aparecida Varanda.
1. Mutagenicidade. 2. Antimutagenicidade. 3. *Byrsonima spp.* 4. RYA.  
5. E-screen. 6. Teste de AMES. I. Varanda, Eliana Aparecida, orient. II. Título.

**CAPES: 40300005**

**Esta dissertação foi realizada com apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)- Processo nº 2012/06369-3 e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).**

## DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação de mestrado a meus pais, a quem devo tudo que sou hoje, por serem as pessoas nas quais me espelho, por me darem todo suporte (financeiro e emocional) para a realização deste trabalho e por serem sempre os grandes incentivadores de meus estudos e da busca pelos meus sonhos. Sem vocês não seria a pessoa que sou hoje.

## **AGRADECIMENTOS**

Muito obrigada:

A Deus, por ter permitido que eu existisse e por ser sempre tão bom e generoso em minha vida.

A Profa. Dra. Eliana A. Varanda, por ter me dado um voto de confiança e me aceitado como sua aluna. Por todo ensinamento e experiências dadas e, também, por deixar sempre suas portas abertas para conversar sobre o trabalho ou outras coisas, não importando quão ocupada estivesse.

A minha família, meus pais Neide e José Antonio e meu irmão Flávio, por todo apoio, incentivo e paciência durante estes anos de pós- graduação.

Ao meu namorado Guilherme, por ter sido a melhor companhia durante estes anos, pela amizade, paciência, e por sempre me ensinar a ser uma pessoa melhor. Com certeza estes anos foram muito mais felizes e melhores ao seu lado.

Aos amigos de Mococa, Laura Vieira, Jocasta Carraro, Mateus Fioresi e Inaiê Melo, pela amizade de todos esses anos, por todos os momentos e por tornar todas as voltas a Mococa muito mais divertidas.

Aos amigos Moacir, Regina, Kauê e Raíssa por sempre me receberem muito bem em suas casas, que é praticamente minha segunda casa em Mococa, e por serem grandes incentivadores do meu mestrado quando eu mesma ainda tinha dúvidas. E, principalmente, a Inaiê, minha melhor amiga desde sempre, por me acalmar quando precisei, por todas as conversas e por mostrar que distância e tempo são coisas que não mudam nossa amizade, embora nós mesmas já tenhamos mudado muito.

Aos amigos do laboratório de Mutagênese, Paula, Cate, Mariana, Flávia, Ana, Rone, Márcio, Maryá, Débora e Renata por toda companhia, paciência e aprendizado durante estes anos. Posso dizer com toda certeza que aprendi muito com cada um de vocês, e que vocês fizeram diferença nestes anos.

A amiga Paula Boldrin, novamente, por ter me acolhido tantas vezes quantas foram necessárias, por sempre ter sido um “refúgio” em Araraquara, pelas conversas, sonhos e expectativas compartilhados. Por todo ensinamento, ajuda e colaboração dada. Para você eu sempre terei um lugar no meu guarda-chuva.

Aos amigos da Pós-Graduação, Carol Barcellos, Bruna Bonifácio, Mariana Rozatto, Teresa Cofre, Kamila, Vanessa Meyagusku, e Silva Cristina, por teres tornado muitas disciplinas mais divertidas e fáceis, pelas conversas sobre nossos desesperos, objetivos e frustrações durante estes anos de Pós-Graduação.

Aos amigos do laboratório de Micobacteriologia, Profa. Queico, Daisy Nakamura, Adolfo Barreto, Marcelo Miyata, Fernando Pavan, José Pandolfi, Leonardo Marino e Paula Souza, por toda companhia e conversas durante estes anos e por todo ensinamento dado durante minha IC, que com certeza contribuiu muito nestes anos de mestrado. A Paula, por ter me acolhido em sua casa, e por ter sido ótima companhia durante o congresso.

Aos amigos da época de Eurofarma, Ana Paula, Juliana, Raquel, Lidiane, Carol Yumi e Rodolfo, por terem compartilhado comigo muitas das minhas frustrações e por terem me auxiliado (ou não heheh) nas minhas decisões, e por terem tornado muitos dias mais alegres.

As amigas da época graduação Liany Garves (minha ex roommate preferida), Luana Nanci, Kátia Matsumoto, Cláudia Sato, Priscila Yuri, Carolina Costa e Letícia Tirtaprawita, por acompanharem diversas mudanças durante minha vida e estarem presentes em todas elas.

As amigas Cristiane Silva, Gabriela Robi e Nayara Cauneto, por serem minha família de Araraquara, por todos os momentos, almoços, conversas jogadas foras e por terem tornado todos esses dias muito mais felizes.

Ao amigo Dr. Mario Antonio Reis, por todas as conversas e discussões, e por ensinar que amar o próximo sem esperar nada em troca é sempre a melhor opção.

A Dra. Mariana Santoro, pela disposição durante meu exame geral de Qualificação e por ter dado sugestões valiosas.

A Profa. Denise Crispim Tavares, por ter participado do meu exame Geral de Qualificação e da Defesa de Dissertação, por toda disponibilidade sempre oferecida, e por todo conteúdo que acrescentou a este trabalho.

A Profa. Dra. Miriam Sannomiya, por toda contribuição durante a defesa de minha dissertação, pelas gentilezas oferecidas e pela troca de emails com informações e discussões sobre meu trabalho, mesmo após a defesa, que foram sempre muito pertinentes.

A José de Sousa Lima Neto, por ter cedido as amostras que utilizei neste trabalho.

Ao programa de Pós- graduação de Biociências e Biotecnologia aplicadas à farmácia, pela oportunidade concedida.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação, por todo serviço prestado e informações dadas.

A todos os funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP, pelos serviços mais simples prestados, mas que sem eles não teria sido possível realizar este trabalho.

A todos funcionários da STAEPE, por toda ajuda durante esses anos.

Aos amigos e funcionários do Departamento de Ciências Biológicas, Margarete, Sílvia, Silvinha, Luciano, Néia e Marisa por toda disposição de sempre.

A FAPESP e CNPq, pelas bolsas de pós-graduação concedidas, e FAPESP por ter financiado este projeto.



**“Por vezes sentimos que aquilo que  
fazemos não é senão uma gota de água  
no mar. Mas o mar seria menor se lhe  
faltasse uma gota”  
(Madre Teresa de Calcutá)**

**“Escolhe um trabalho de que gostes,  
e não terás que trabalhar nem um dia na tua vida”  
(Confúcio)**

## **Sumário**

Resumo

Abstract

Lista de siglas e abreviaturas

Lista de figuras

Lista de tabelas

<b>CAPÍTULO I</b>	18
<b>1. Introdução</b>	19
1.1 Importância do estudo de plantas medicinais	19
1.2 Sobre o gênero <i>Byrsonima</i>	21
1.3 Importância da avaliação de atividade mutagênica	23
1.4 Importância da avaliação de atividade antimutagênica	26
1.5 Importância da avaliação de atividade estrogênica	29
<b>2. Objetivos</b>	33
<b>3. Materiais e métodos</b>	34
3.1 Obtenção dos extratos	34
3.1.1 Coleta, caracterização e preparo do material vegetal	34
3.1.2 Preparo dos extratos	35
3.2 Avaliação da mutagenicidade pelo Teste de Ames	35
3.2.1 Linhagens	35

3.2.2	Controles	35
3.2.3	Realização do ensaio	36
3.2.4	Análise dos resultados	36
3.3	Avaliação da antimutagenicidade pelo Teste de Ames	37
3.3.1	Linhagens	37
3.3.2	Controle	37
3.3.3	Ensaio de Viabilidade celular	37
3.3.4	Realização do ensaio	39
3.3.5	Análise dos resultados	40
3.4	Avaliação da estrogenicidade pelo Teste RYA	40
3.4.1	Linhagens utilizadas	40
3.4.2	Controles utilizados	40
3.4.3	Realização do ensaio	41
3.4.4	Análise dos resultados	42
3.5	Ensaio de citotoxicidade para E-screen	43
3.5.1	Linhagem	43
3.5.2	Controles	44
3.5.3	Realização do ensaio	44
3.5.4	Ensaio colorimétrico da Sulforodamina B	45
3.6	Avaliação da estrogenicidade pelo ensaio de proliferação celular E-screen	46

3.6.1	Linhagem	46
3.6.2	Remoção de estrógenos endógenos do SBF	46
3.6.3	Controles	46
3.6.4	Realização dos ensaios	47
3.6.5	Ensaio colorimétrico da Sulforodamina	47
3.6.6	Análise dos resultados	47
<b>4.</b>	<b>Resultados</b>	<b>49</b>
4.1	Avaliação da mutagenicidade	49
4.2	Avaliação da antimutagenicidade	54
4.3	Avaliação de estrogenicidade pelo Teste RYA	57
4.4	Avaliação de estrogenicidade pelo E-screen	59
4.4.1	Avaliação de citotoxicidade de 24 horas	59
4.4.2	Avaliação de citotoxicidade de 144 horas	61
4.4.3	Avaliação do E-screen	63
<b>5.</b>	<b>Discussões</b>	<b>67</b>
<b>6.</b>	<b>Conclusões</b>	<b>82</b>
<b>7.</b>	<b>Referências bibliográficas</b>	<b>84</b>
	<b>Anexo I- Lista de soluções utilizadas</b>	<b>96</b>
	<b>CAPÍTULO II</b>	<b>101</b>

## Resumo

O cerrado brasileiro contém inúmeras plantas utilizadas no tratamento popular de várias enfermidades onde destacamos as espécies do gênero *Byrsonima*. Os relatos de seu uso são diversos: tratamento de infecções fúngicas e bacterianas, feridas crônicas, doença de Chagas, contra tuberculose, como diurética, antiemética e etc. Na literatura, há comprovação para atividades: antioxidante, antiprotozoário, depressor no Sistema Nervoso Central (SNC), antihiperlipidêmicas e antihiperlipidêmica. O perfil fitoquímico demonstra taninos, flavonóides, triterpenos, ésteres aromáticos, entre outros, o que indica o potencial farmacológico deste gênero. Sabe-se que o uso não padronizado de plantas pode ser danoso aos usuários, devido a propriedades desconhecidas ou por conterem contaminantes ambientais. Embora haja diversos estudos abordando o potencial biológico das plantas deste gênero, amplamente utilizadas na medicina popular, ainda há poucos estudos sobre sua segurança. Por esta razão, o objetivo deste trabalho foi avaliar as atividades mutagênica, antimutagênica e estrogênica de extratos etanólicos padronizados (70%) de folhas de quatro espécies: *Byrsonima verbascifolia*, *Byrsonima coccolobifolia*, *Byrsonima correifolia* e *Byrsonima ligustrifolia*. A atividade mutagênica foi realizada pelo Teste de Ames, utilizando o ensaio de pré-incubação, na ausência e presença de ativação metabólica (S9). As linhagens utilizadas foram TA98, TA97a, TA100 e TA102 e foram testadas cinco concentrações de cada amostra. A atividade antimutagênica foi testada apenas para as amostras negativas para o teste de Ames (*B. verbascifolia* e *B. correifolia*), com a diferença que sempre foi associada a um agente mutagênico conhecido. A atividade estrogênica foi avaliada por dois testes: -*Recombinant Yeast Assay* (RYA) que utiliza a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (linhagem BY4741) modificada geneticamente, contendo um gene para receptor estrogênico humano e um plasmídeo que expressa a enzima  $\beta$ -galactosidase de *Escherichia coli* e - E-screen um ensaio que avalia a proliferação celular de células MCF-7 BUS (câncer de mama). *B. verbascifolia* e *B. correifolia* foram consideradas não mutagênicas, enquanto *B. coccolobifolia* e *B. ligustrifolia* foram mutagênicas. *B. verbascifolia* e *B. correifolia* foram consideradas como forte

antimutagênicas contra os mutágenos 4-nitro-o-fenilenodiamina (NPD), aflatoxina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) e benzo(a)pireno (B[a]P), enquanto não apresentaram potencial antimutagênico para mitomicina C (MMC). No ensaio RYA, *B. verbascifolia* e *B. coccolobifolia* foram consideradas como não estrogênicas enquanto *B. correifolia* e *B. ligustrifolia* apresentam um baixo potencial estrogênico quando comparados ao 17β-estradiol e outras plantas consideradas estrogênicas. No ensaio E-screen, todas as amostras foram consideradas como não estrogênicas.

Palavras-chave: antimutagenicidade, *Byrsonima*, estrogenicidade, mutagenicidade, E-screen, RYA e Teste de AMES.

## Abstract

The Brazilian cerrado contain several native plants used in folk medicine for treating many diseases. Plants of the genus *Byrsonima* are one of them. There are several reports of its use: the treatment of fungal and bacterial infections, chronic wounds, Chagas disease, tuberculosis, as a diuretic and antiemetic. In literature there is evidence for activities: antioxidant, antiprotozoal, depressing CNS, antihyperglycemic and antihyperlipemic. The phytochemical profile shows tannins, flavonoids, triterpenes, aromatic esters and others, which indicates the pharmacological potential of this genus. It is known that the use of non-standard plant can be harmful to users due to unknown properties or for containing environmental contaminants. Although there are several studies about the biological potential of plants of this genus, widely used in folk medicine, there are few studies about their safety. For this reason, the aim of this study was to investigate the mutagenic, antimutagenic and estrogenic activities of standardized ethanolic extracts (70%) of leaves of four species: *Byrsonima verbascifolia*, *Byrsonima correifolia*, *Byrsonima coccolobifolia* and *Byrsonima ligustrifolia*. Mutagenic activity was evaluated by Ames Test, performed according to preincubation assay, in absence and presence of metabolic activation system (S9). TA98, TA97a, TA100 and TA102 strains were used and five concentrations of each sample, in triplicates, were tested. For antimutagenicity assay were used only the samples negative in Ames Test (*B. verbascifolia* and *B. correifolia*), with the difference that samples were associated a known mutagenic agent. The estrogenic activity was evaluated by two assays: -The Recombinant Yeast Assay (RYA) uses the yeast *Saccharomyces cerevisiae* (BY4741 strain) genetically modified, containing a gene for human estrogen receptor and a plasmid which expresses the  $\beta$ -galactosidase enzyme of *Escherichia coli* and - E-screen, a test that evaluates the proliferation on MCF-7-BUS cells (breast cancer). *B. verbascifolia* and *B. correifolia* were considered as non mutagenic, meanwhile *B. coccolobifolia* and *B. ligustrifolia* were considered as mutagenic. *B. verbascifolia* and *B. correifolia* were considered as strong antimutagenic against 4-nitro-o-phenylenediamine (NPD), aflatoxin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) and benzo[a]pyrene (B[a]P), however

didn't demonstrate antimutagenic potential for mitomycin C (MMC). In RYA, *B. verbascifolia* and *B. coccolobifolia* were considered as non estrogenic, while *B. correifolia* and *B. ligustrifolia* showed a low estrogenic potential when compared to 17 $\beta$ -estradiol and another plants considered as estrogenic. In E-screen, all samples were considered as non estrogenic.

Key words: antimutagenicity, *Byrsonima*, estrogenicity, mutagenicity, E-Screen, RYA and AmesTest.



## Lista de Siglas e abreviaturas

AFB<sub>1</sub>- Aflatoxina B<sub>1</sub>  
ANOVA- análise de variância  
AZS- Azida sódica  
B[a]P- Benzo(a)pireno  
CAM- Complementary and alternative medicine  
DMEM- Dulbecco's modification of Eagle's médium  
DMSO- Dimetilsulfóxido  
DNA- Ácido desoxoribonucléico  
DO- Densidade óptica  
DP- Desvio Padrão  
EC50- Concentração efetiva mediana  
EEQ- Equivalentes em estradiol  
EP- efeito proliferativo  
EPR- Efeito proliferativo relativo  
E2- estradiol  
FSH- Hormônio folículo estimulante  
HCL- Ácido clorídrico  
HDL- high-density lipoprotein (lipoproteínas de alta densidade)  
LDL- low-density lipoprotein (lipoproteínas de baixa densidade)  
LH- Hormônio luteinizante  
MMC- Mitomicina C  
MuGal- 4-metilumbeliferona β-D-galactopiranosídeo  
NPD- 4-nitro-o-fenilenodiamina  
OMS- Organização Mundial de Saúde  
RYA- *Recombinant Yeast Assay*  
RM- Razão de mutagenicidade  
rpm- rotações por minuto  
SBF- Soro Bovino Fetal  
SNC- Sistema Nervoso Central

SUS- Sistema Único de Saúde

S9- Sistema de ativação microsomal: fração microsomal de homogeneizado de fígado de ratos

UFC- Unidades formadoras de colônia

UV- Ultravioleta

YPD- *Yeast Nitrogen Base*

2-AA- 2-aminoantraceno

2-AF- 2-aminofluoreno

## Lista de Figuras

<b>Figura 1.</b> Visão geral dos mecanismos diretos e indiretos de agentes genotóxicos	28
<b>Figura 2.</b> Esquema sobre diluições seriadas do teste de Viabilidade celular	39
<b>Figura 3.</b> Avaliação da atividade da enzima $\beta$ -galactosidase expressa em unidades de fluorescência média induzida por cada uma das cinco concentrações testadas de extrato de <i>B. correifolia</i> , no primeiro minuto e no vigésimo minuto	58
<b>Figura 4.</b> Avaliação da atividade da enzima $\beta$ -galactosidase expressa em unidades de fluorescência média induzida por cada uma das cinco concentrações testadas de extrato de <i>B. ligustrifolia</i> , no primeiro minuto e no vigésimo minuto	59
<b>Figura 5.</b> Viabilidade celular em células MCF-7 BUS após 24 horas de tratamento com cinco diferentes concentrações de <i>B. verbascifolia</i> .	60
<b>Figura 6.</b> Viabilidade celular em células MCF-7 BUS após 24 horas de tratamento com cinco diferentes concentrações de <i>B. correifolia</i>	60
<b>Figura 7.</b> Viabilidade celular em células MCF-7 BUS após 24 horas de tratamento com cinco diferentes concentrações de <i>B. coccolobifolia</i>	60
<b>Figura 8.</b> Viabilidade celular em células MCF-7 BUS após 24 horas de tratamento com cinco diferentes concentrações de <i>B. ligustrifolia</i>	61
<b>Figura 9.</b> Viabilidade celular em células MCF-7 BUS após 144 horas de tratamento com cinco diferentes concentrações de <i>B. verbascifolia</i>	61
<b>Figura 10.</b> Viabilidade celular em células MCF-7 BUS após 144 horas de tratamento com cinco diferentes concentrações de <i>B. correifolia</i>	62
<b>Figura 11.</b> Viabilidade celular em células MCF-7 BUS após 144 horas de tratamento com cinco diferentes concentrações de <i>B. coccolobifolia</i>	62
<b>Figura 12.</b> Viabilidade celular em células MCF-7 BUS após 144 horas de tratamento com cinco diferentes concentrações de <i>B. ligustrifolia</i>	62
<b>Figura 13.</b> Viabilidade celular em MCF-7 BUS após o ensaio de E-screen com tratamento com cinco diferentes concentrações de <i>B. verbascifolia</i> .	65
<b>Figura 14.</b> Viabilidade celular em MCF-7 BUS após o ensaio de E-screen com tratamento com cinco diferentes concentrações de <i>B. correifolia</i> .	65
<b>Figura 15.</b> Viabilidade celular em MCF-7 BUS após o ensaio de E-screen com tratamento com cinco diferentes concentrações de <i>B. coccolobifolia</i> .	65
<b>Figura 16.</b> Viabilidade celular em MCF-7 BUS após o ensaio de E-screen com tratamento com cinco diferentes concentrações de <i>B. ligustrifolia</i> .	66
<b>Figura 17.</b> Estrutura de compostos estrogênicos	80

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1.</b> Atividade mutagênica avaliada pelo número de revertentes/placa $\pm$ DP e razão de mutagenicidade (RM) induzida pelo extrato etanólico 70% de <i>B. verbascifolia</i> , na presença (+S9) e ausência (-S9) de ativação metabólica, com as cepas TA98, TA100, TA97a e TA102 de <i>Salmonella typhimurium</i>	50
<b>Tabela 2.</b> Atividade mutagênica avaliada pelo número de revertentes/placa $\pm$ DP e razão de mutagenicidade (RM) induzida pelo extrato etanólico 70% de <i>B. correifolia</i> , na presença (+S9) e ausência (-S9) de ativação metabólica, com as cepas TA98, TA100, TA97a e TA102 de <i>Salmonella typhimurium</i>	51
<b>Tabela 3.</b> Atividade mutagênica avaliada pelo número de revertentes/placa $\pm$ DP e razão de mutagenicidade (RM) induzida pelo extrato etanólico 70% de <i>B. coccolobifolia</i> , na presença (+S9) e ausência (-S9) de ativação metabólica, com as cepas TA98, TA100, TA97a e TA102 de <i>Salmonella typhimurium</i>	52
<b>Tabela 4.</b> Atividade mutagênica avaliada pelo número de revertentes/placa $\pm$ DP e razão de mutagenicidade (RM) induzida pelo extrato etanólico 70% de <i>B. ligustrifolia</i> , na presença (+S9) e ausência (-S9) de ativação metabólica, com as cepas TA98, TA100, TA97a e TA102 de <i>Salmonella typhimurium</i>	53
<b>Tabela 5.</b> Atividade antimutagênica avaliada pelo número de revertentes/placa $\pm$ DP e porcentagem de inibição de crescimento de revertentes (%I) por associação de extrato etanólico 70% de <i>B. verbascifolia</i> , com mutágenos diretos (NPD e MMC) e indiretos (AFB <sub>1</sub> e B[a]P), com as cepas TA98, TA102 e TA100 de <i>Salmonella typhimurium</i>	55
<b>Tabela 6.</b> Atividade antimutagênica avaliada pelo número de revertentes/placa $\pm$ DP e porcentagem de inibição de crescimento de revertentes (%I) por associação de extrato etanólico 70% de <i>B. correifolia</i> , com mutágenos diretos (NPD e MMC) e indiretos (AFB <sub>1</sub> e B[a]P), com as cepas TA98, TA102 e TA100 de <i>Salmonella typhimurium</i>	56
<b>Tabela 7.</b> Atividade estrogênica avaliada pelo número de EEq $\pm$ DP das amostras <i>B. verbascifolia</i> , <i>B. correifolia</i> , <i>B. coccolobifolia</i> e <i>B. ligustrifolia</i> .	57
<b>Tabela 8.</b> Atividade estrogênica expressa pela média de EP, seu DP e EPR de <i>B. verbascifolia</i> , <i>B. correifolia</i> , <i>B. coccolobifolia</i> e <i>B. ligustrifolia</i> avaliadas pelo E-screen	64
<b>Tabela 9.</b> Comparação dos resultados de citotoxicidade e E-screen	78

# Capítulo I

## **1. Introdução**

### **1.1. Importância do estudo de plantas medicinais**

O conhecimento sobre plantas medicinais acompanha a história de evolução do conhecimento humano desde as civilizações mais antigas até os dias de hoje. O homem primitivo, sem recursos, descobriu por instinto, sorte e observação como curar suas doenças e feridas. A história do uso terapêutico de drogas naturais já dura milênios, assim como a história da medicina (DE PASQUALE, 1984).

O uso de plantas medicinais na medicina popular é baseado em um conhecimento empírico adquirido por séculos em diferentes grupos étnicos. A ideia de se tratar e prevenir doenças com plantas e/ ou suas partes, preparadas de diversas maneiras, é antiga. É baseada na experiência diária que foi passada de geração em geração e, hoje, constitui a base da medicina moderna (MENDANHA et al., 2010).

Devido a Revolução Industrial e o desenvolvimento da Química Orgânica, preferiu-se realizar os tratamentos farmacológicos com drogas sintéticas. Isto ocorreu devido à facilidade em sintetizar grandes quantidades, à facilidade em modificações estruturais que melhoram a atividade farmacológica podendo tornar a droga mais segura e também devido ao poder econômico da indústria farmacêutica (RATES, 2001).

Nos dias de hoje, com a diminuição do surgimento de novos fármacos, voltou-se para a natureza com outros olhos, buscando novas formas terapêuticas, e os resultados têm sido notáveis. O estudo de fármacos antigamente utilizados, que estavam em desuso, causou uma redescoberta de agentes terapêuticos utilizados há milênios (DE PASQUALE, 1984).

Nos últimos anos, aumentou-se a popularidade da ideia de que medicamentos a base de plantas e produtos naturais são mais seguros do que os medicamentos sintéticos, gerando um crescimento no consumo de fitofármacos (SILVA et al., 2008). É a ideia velha de que “o que é natural não faz mal”.

Outro ponto relevante é que muitas vezes, a medicina popular é o único acesso para muitas populações tratarem suas doenças (RATES, 2001). Desta forma, mais do que um hábito e mais do que uma crença, grande parte da população brasileira não tem condições financeiras para adquirir medicamentos alopáticos, e o uso de plantas acaba sendo a única forma de tratar suas doenças.

Cerca de 25% dos medicamentos prescritos em todo o mundo são provenientes de plantas. Dos 252 considerados essenciais pela Organização Mundial de Saúde (OMS), 11% são exclusivamente de origem vegetal. Além disso, há um número significativo de drogas sintéticas obtidas a partir de precursores naturais (RATES, 2001).

No Brasil, em 2008, foi criada a Portaria Interministerial nº 2960, que aprova o Programa Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos e cria o comitê Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos. Este Programa visa “garantir à população brasileira o acesso seguro e o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos, promovendo o uso sustentável da biodiversidade, o desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria nacional”, e pretende aumentar o número de fitoterápicos oferecidos pelo Sistema Único de Saúde(SUS) (Portal da Saúde, 2009).

Em 2012, o Ministério da Saúde investiu 6,7 milhões no Programa, repassando o valor para 12 municípios, apoiando o projeto Arranjos Produtivos Locais de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos no SUS. “O montante visa o investimento na aquisição de equipamentos e materiais, contratação de pessoal e qualificação técnica para promover a interação e a cooperação entre os agentes produtivos, o desenvolvimento de toda a cadeia produtiva, a produção e a distribuição de plantas medicinais e fitoterápicos no SUS” (Portal da Saúde, 2012).

Portanto, o estudo com plantas medicinais utilizadas tradicionalmente é valioso em dois pontos distintos: em primeiro lugar, como fonte de potenciais novas drogas quimioterápicas (agentes químicos produzidos por síntese química, ou seja, não possuem origem natural); em segundo lugar, como medida de segurança para a população que faz uso contínuo uma vez que não conhecendo o perfil fitoquímico, a

planta pode possuir agentes tóxicos. As plantas e os microorganismos são as fontes mais importantes para a indústria em relação à pesquisa de novos de medicamentos (BOUHLEL et al., 2007).

O estudo com plantas possibilita não só a confirmação de muitas atividades terapêuticas descritas por antepassados, mas também a descoberta de novas moléculas com atividades ainda desconhecidas. Hoje, pode-se dizer que as plantas são uma fonte inesgotável de agentes terapêuticos.

### **1.2.Sobre o gênero *Byrsonima***

O cerrado brasileiro é uma das regiões mais diversificadas existentes, que contém inúmeras plantas nativas utilizadas no tratamento popular de várias enfermidades (ALMEIDA, 1998).

A família Malpighiaceae apreende 63 gêneros, abrangendo em média 800 espécies pantropicais, sendo que o Brasil apresenta em média 32 gêneros, com 300 espécies distribuídas por diversas regiões (BARROSO, 1984).

O gênero *Byrsonima*, pertencente à família Malpighiaceae, possui aproximadamente 150 espécies, amplamente distribuídas pelo Brasil e popularmente utilizadas para tratamento de problemas gastrointestinais. Muitos estudos confirmam diversas atividades biológicas deste gênero, incluindo ação antioxidante, antibacteriana, antifúngica e antiprotozoários (GUILHON-SIMPLICIO &PEREIRA, 2011).

No geral, as espécies de *Byrsonima* são arbóreas e são popularmente conhecidas como “murici” e “fruta de jacu” (SANDER et al., 1978; SOUZA, 1980). Algumas produzem frutos comestíveis e são até cultivadas pela população rural em pomares, como é o caso de *Byrsonima verbascifolia* (LORENZI, 1998).

O extrato etanólico de folhas de *B. verbascifolia* apresentou uma forte atividade *in vitro* contra rotavirus, vírus comumente relacionado à diarreia grave em crianças e neonatos. Os resultados com seu extrato sugerem inibição de replicação viral do



rotavírus. O extrato etanólico de folhas de *Byrsonima coccolobifolia* também apresentou atividade, embora não significativa (CECILIO et al., 2012).

O extrato aquoso (infusão) das cascas do caule de *Byrsonima japurensis*, conhecida popularmente como “saratudo”, apresentou atividades antiinflamatórias, gastroprotetoras e anti-hiperalgésica *in vivo*, também apresentou atividades antioxidantes e antiplaquetárias *in vitro*, o que sugere ter menos efeitos colaterais quando comparados ao uso de antiinflamatórios não-esteroidais (GUILHON-SIMPLICIO et al., 2012).

A espécie *Byrsonima myricifolia* possui frutos ricos em minerais, e muitos destes elementos são essenciais aos processos bioquímicos, dos quais 13 são destacados: Na, Mg, Al, P, Ca, V, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, Pb e K (VALLILO et al., 2007).

Resultados de experimentos recentes sugerem que o extrato etanólico de folhas de *Byrsonima sericea* é gastroprotetora por diversos mecanismos (RODRIGUES, et al., 2012).

As folhas de *B. verbascifolia* são amplamente utilizadas no tratamento de diarreia e infecções intestinais, e também para proteção da mucosa intestinal. As raízes são recomendadas para feridas crônicas, doença de Chagas, para infecções da cavidade oral e do trato genital feminino (PANIZZA, 1998).

O extrato metanólico de folhas de *Byrsonima crassa* pode ser considerado uma fonte potencial de antioxidantes naturais utilizada no tratamento de úlceras, atenuando os danos causados por espécies reativas de oxigênio na mucosa gástrica e possui efeito gastroprotetor contra danos causados por HCL (ácido clorídrico) e etanol em mucosas de ratos (BONACORSI et al., 2012).

Em relação a *Byrsonima crassifolia*, o extrato metanólico de folhas e cascas, demonstrou ser fonte de compostos antioxidantes (SILVA et al., 2007), o extrato etanólico de folhas demonstrou atividade anti *Trypanosoma cruzi* (BERGER et al., 1998) e o extrato aquoso de folhas e cascas apresentou efeito depressor no sistema nervoso central (SNC) (MORALES et al., 2001). Além disso, os extratos hexânico e

clorofórmico de frutos e sementes apresentaram propriedades antihiperglicêmicas, antihiperlipêmica e antiglicação em ratos diabéticos (PEREZ-GUTIERREZ et al., 2010).

O extrato aquoso de folhas de *Byrsonima intermedia* é usado tradicionalmente para o tratamento de febre, infecções fúngicas e bacterianas, assim como doenças da pele e gastrointestinais (NOGUEIRA et al., 2007; AGRA et al., 2008). Além disso, demonstrou capacidade de redução da inflamação (MOREIRA et al., 2011).

Outras espécies de *Byrsonima* são utilizadas como antipiréticas, para infecções da pele e contra a asma (CÁCERES et al., 1993).

Embora na literatura haja relatos de diversos usos populares diferentes para plantas do gênero *Byrsonima*, seu uso popular principal é para problemas do trato intestinal.

A análise química de espécies de *Byrsonima* demonstrou presença de taninos, flavonóides, terpenos, catequinas entre outros (CARDOSO et al., 2006; SANNOMIYA et al., 2005a), o que demonstra a variedade fitoquímica e potencial farmacológico das espécies.

### **1.3. Importância da avaliação de atividade mutagênica**

A idéia de que “o ‘natural’ não faz mal” já está ultrapassada na ciência e no meio acadêmico, no entanto, a população mais carente ainda acredita nela. Esta crença, aliada ao não conhecimento real biológico das plantas, pode torná-las um perigo para a população que faz uso delas como fonte de cuidados básicos à saúde, um meio alternativo ao uso de medicamentos.

Sem o conhecimento exato do perfil fitoquímico e das atividades farmacológicas reais de uma determinada espécie, as plantas podem se tornar danosas a quem as utiliza. Além disso, em quantidades não controladas, os ativos podem ser tóxicos.

Mutações são alterações permanentes na sequência de nucleotídeos do DNA e, ao acumular mutações, um gene de divisão celular pode ser afetado, podendo

originar um câncer (NELSON & COX, 2011). Por esta razão, é de interesse avaliar o potencial mutagênico de um extrato.

Segundo dados da OMS, o câncer é uma das principais causas de morte no mundo e foi responsável por aproximadamente 13% de todas as mortes em 2008 sendo que cerca de 70% ocorreram em países de baixa e média renda (WHO, 2013).

O teste empregado para avaliação da atividade mutagênica das amostras foi o teste de Ames com *Salmonella typhimurium* (MARON & AMES, 1983) que utiliza cepas com mutações nos genes operon da histidina, tornando-as histidina dependentes. Cada cepa possui uma mutação distinta, de modo que todas elas sejam auxotróficas para histidina. Estas mutações agem como alvo para novas mutações, que podem restaurar a função de um gene, revertendo a situação de dependência de histidina. Em um meio mínimo, apenas as cepas que conseguem reverter a situação “histidina-dependente” crescem. Na presença de um mutágeno, o número de colônias revertentes aumenta. Assim, as células que sofrem novas mutações são denominadas revertentes.

Além da mutação de histidina, as cepas contêm outras mutações que aumentam a capacidade em detectar mutágenos. A mutação *rfa* causa perda parcial na membrana de lipopolissacarídeo, aumentando a permeabilidade para moléculas grandes que não penetrariam normalmente na membrana. Esta mutação pode ser confirmada pelo teste de sensibilidade ao cristal violeta. A mutação *uvrB* é uma deleção em um gene que codifica o sistema de reparo por excisão de ácido desoxiribonucléico (DNA), aumentando a sensibilidade na detecção de mutágenos. Esta deleção estendeu-se até o gene de síntese de biotina, conseqüentemente, as bactérias necessitam de biotina para sobreviver. TA102 não contém esta mutação. Pode-se confirmar esta mutação pela sensibilidade à luz Ultra Violeta (UV) (MARON & AMES, 1983).

Todas as cepas possuem o plasmídeo Fator R, ou pKM101, que aumenta a mutagênese química e espontânea por otimizar o sistema de reparo “error prone”.

Este plasmídeo contém gene de resistência à ampicilina. Pode-se confirmar pela resistência à ampicilina (MORTELMANS & ZEIGER, 2000).

A cepa TA102 possui o plasmídeo pAQ1, que carrega mutação no gene *hisG428* e gene resistência à tetraciclina. Este plasmídeo aumenta o número de sítios alvos e pode ser confirmado pela resistência à tetraciclina. As linhagens TA98 e TA97a detectam mutações do tipo *frameshift*, TA100 detecta substituições de pares de bases e TA102 detecta eficientemente vários mutágenos, como formaldeído, hidroperóxidos, bleomicina e mitomicina C, que são dificilmente detectados nas outras cepas (MARON & AMES, 1983).

*Qualea parviflora*, planta medicinal usada popularmente como anti-séptica e antiinflamatória, foi avaliada pelo Teste de Ames e não foi considerada como mutagênica, o que contribui para a segurança de seu uso (MAZZOLIN et al., 2010).

*Qualea multiflora* e *Qualea grandiforma*, plantas medicinais utilizadas para tratar problemas gastrointestinais e como antiinflamatórios, exibiram atividade mutagênica quando avaliadas pelo Teste de Ames (SANTOS et al., 2011). Este fato demonstra que algumas espécies, dentro de um mesmo gênero, podem ser seguras para o uso, enquanto outras não.

*Dipteryx alata*, pertencente a família das leguminosas, possui propriedades medicinais, e seu extrato não foi considerado mutagênico quando submetido ao teste de Ames (ESTEVEZ-PEDRO, et al., 2012).

Chen et al., (2013), em seu estudo com *Lignosus rhinocerotis*, um cogumelo utilizado na medicina tradicional contra febre, asma e câncer, avaliaram sua mutagenicidade através do Teste de Ames e constataram que não houve mutagenicidade para nenhuma das cinco linhagens avaliadas, nem na presença e nem na ausência de sistema de ativação metabólica (fração S9).

Parella et al., (2013), avaliaram amostras do Rio Volturno (Itália) através do Teste de Ames, com apenas duas linhagens, e detectaram que três das cinco amostras avaliadas causaram aumento significativo do número de revertentes.

Estudos recentes realizados pelo nosso grupo demonstraram que *B. crassa* e *B. intermedia* apresentam atividade mutagênica quando avaliadas pelo teste de Ames, que detecta mutações de ponto (CARDOSO et al., 2006; SANNOMIYA et al., 2007).

Tais dados demonstram a importância do Teste de Ames, não só assegurando o uso seguro de plantas medicinais, como demonstrando o risco do uso sem uma avaliação detalhada. Além disso, também demonstram o risco de amostras ambientais presentes no nosso dia-a-dia.

#### **1.4. Importância da avaliação de atividade antimutagênica**

No nosso dia-a-dia, entramos em contato com diversos compostos com potencial mutagênico. Estes compostos estão presentes tanto no ar, contaminado com poluentes de indústria e trânsito, como nos cosméticos que utilizamos e até mesmo em grande parte dos alimentos industrializados, tão consumidos nos dias de hoje. Desta forma, é interessante identificar compostos que possivelmente diminuam estes efeitos.

Como por exemplo, pode-se citar os antioxidantes naturais, que podem, isoladamente ou em combinação com a dieta, fornecer benefícios para a quimioprevenção (SAEIDNIA & ABDOLLAHI, 2013).

Os chás, que são as bebidas mais amplamente consumidas no mundo depois da água, possuem polifenóis (catequinas), que reduziram o risco de várias doenças, como o câncer. A cúrcuma, especiaria indiana cujo principal ativo é a curcumina, está associada a prevenção do câncer e a outros benefícios a saúde. Ela modula a expressão de miRNA em células cancerígenas. A genisteína, ativo presente na soja, exerce seus efeitos preventivos de câncer através de várias vias diferentes. O resveratrol, polifenol encontrado no vinho tinto e algumas frutas, possui propriedades antioxidantes e antiinflamatórias, e possui efeitos benéficos em doenças cardiovasculares e câncer (THAKUR et al., 2013).

Ou, por exemplo, extratos hexânico e de etil acetato de *Holoptelea integrifolia* que demonstraram efeito significativo citotóxico em células de câncer de próstata e mama (GUO et al., 2013).

Há um aumento nas evidências de que as mutações não estão envolvidas somente no processo de carcinogênese, mas que também desempenham um papel na patogênese de doenças degenerativas crônicas, como aterosclerose e doenças cardíacas, que são as principais causas de morte dos humanos (DE FLORA, 1998).

O câncer geralmente se inicia após uma mutação em uma única célula, que origina progressivas transformações e aquisições de mutações adicionais. Dessa forma, a inibição destas mutações seria uma medida eficiente na prevenção (LOH et al., 2009).

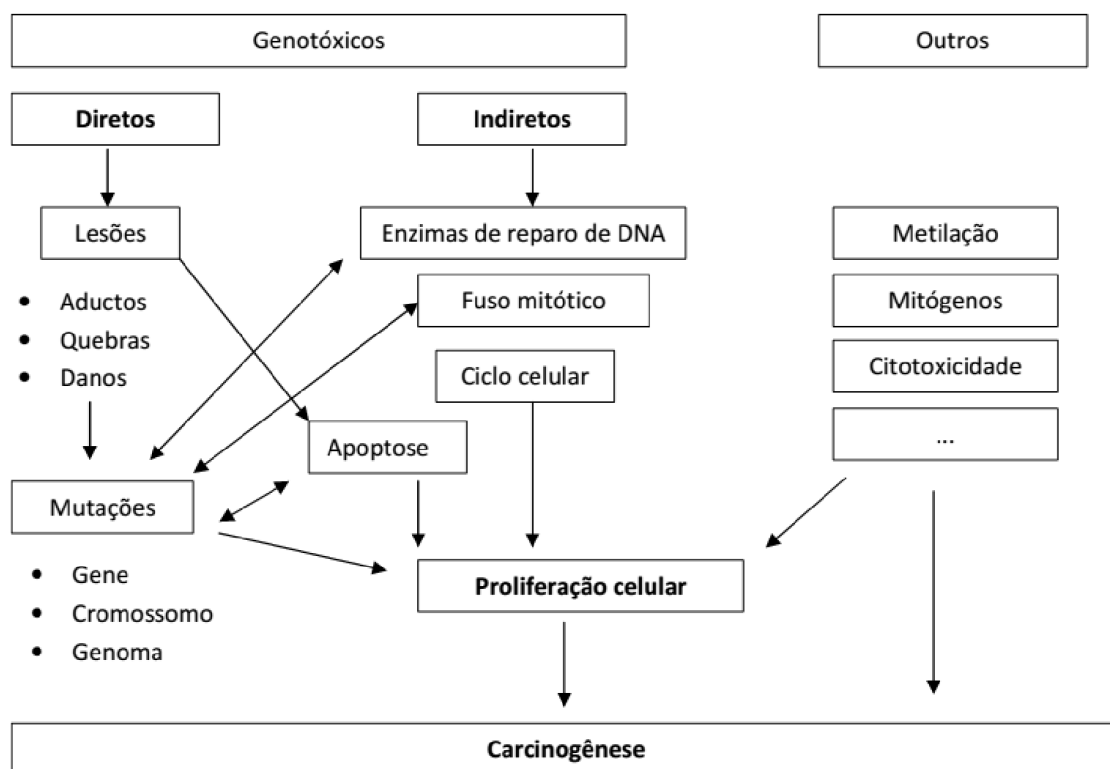
A prevenção de doenças relacionadas a mutações pode ocorrer tanto evitando a exposição aos mutágenos reconhecidos, como favorecendo os mecanismos de defesa fisiológicos, através da ingestão de fatores de proteção. Depois de avaliada a mutagenicidade de um extrato, se negativo, pode-se avaliar a antimutagenicidade, para identificar possíveis substâncias quimiopreventivas. Esta abordagem é conhecida como quimioprevenção e sua aplicação envolve uma análise de eficácia, segurança e de risco-benefício dos agentes protetores (DE FLORA, 1998).

Ainda, segundo Namasivayam (2011), a quimioprevenção pode ser definida como prevenção, inibição ou reversão da carcinogênese, por administração de uma ou mais entidades químicas, sendo elas drogas individuais ou como constituintes de ocorrência natural da dieta. Estas drogas podem ser naturais ou sintéticas. Há dois mecanismos principais envolvidos na quimioprevenção: antimutagênese e antiproliferação.

A antimutagênese inclui a inibição de absorção e ativação de substâncias cancerígenas, a detoxificação de carcinógenos, o bloqueio da ligação carcinógeno-DNA e a otimização de reparo do DNA. Já o mecanismo anti-proliferativo (ou anti-progressão) envolve, por exemplo, a modulação de atividade de fatores de

crescimentos e hormônios, modificações em transdução de sinal, inibição de atividades de oncogenes, promoção de diferenciação celular, modulação do metabolismo do ácido araquidônico e aumento da apoptose (NAMASIVAYAM, 2011).

A Figura 1 mostra uma visão geral dos mecanismos diretos e indiretos pelos quais os agentes genotóxicos atuam na carcinogênese.



**Figura 1-** Visão geral dos mecanismos diretos e indiretos de agentes genotóxicos (KIRSCH-VOLDERS et al., 2003).

Prieto et al. (2013), em seu estudo com *Casearia sylvestris*, planta utilizada popularmente devido suas atividades antiinflamatórias e antiulcerativas, demonstraram que este extrato pode ser considerado como forte antimutagênico contra a aflatoxina B<sub>1</sub> [AFB<sub>1</sub>] e possui atividade antimutagênica moderada frente a mitomicina C (MMC).

Em um estudo de Kumar et al. (2013), foi demonstrado que plumbagina e juglona, dois compostos similares as naftoquinonas, foram capazes de diminuir em até 87% o número de revertentes causados por etilmetanosulfonato na linhagem TA100 de *S. typhimurium*.

*Baccharis dracunculifolia*, planta conhecida no Brasil como “Alecrim-do-campo” é usada na medicina alternativa para o tratamento da inflamação, desordens hepáticas e úlceras estomacais. Apresentou atividade antimutagênica e efeito protetor devido ao sinergismo entre combinação de compostos fitoquímicos (RESENDE et al., 2012).

Resultados do nosso grupo mostram que extratos de *Byrsonima basiloba* apresentaram atividade anti-mutagênica frente aos mutágenos 4-nitro-*o*-fenilenodiamina (NPD), AFB<sub>1</sub>, benzo(a)pireno (B[a]P) e peróxido de hidrogênio (LIRA et al., 2008). Isto mostra o potencial das plantas do gênero *Byrsonima* em interagir com mutágenos diretos e indiretos, reduzindo seus efeitos.

Assim como mencionado na importância da avaliação da atividade mutagênica, tais dados reforçam a importância do Teste de AMES para avaliar plantas de uso popular e compostos químicos. Além disso, o teste pode ser útil para identificação de possíveis compostos quimiopreventivos.

### **1.5. Importância da avaliação de atividade estrogênica**

Desreguladores endócrinos são compostos químicos que podem colocar em risco o equilíbrio de hormônios esteróides no organismo. Estes compostos produzem seus efeitos mimetizando, antagonizando ou alterando os níveis de esteróides endógenos (andrógenos ou estradiol), através de mudanças nas suas taxas de síntese ou metabolismo e/ou expressão ou ação nos receptores (FRYE et al., 2012).

Os desreguladores endócrinos que mimetizam o estradiol (hormônio femininos) são especialmente relevantes, tanto em termos ambientais como de saúde pública (GARCIA-REYERO et al., 2007).



Muitas mulheres costumam usar produtos de soja, ervas e outras terapias complementares e alternativas (“complementary and alternative medicine”- CAM) para seus sintomas de menopausa. A principal razão para o uso desses é o receio dos efeitos adversos e possíveis riscos a longo prazo da terapia de reposição hormonal, pois há uma promoção do uso desses produtos como mais seguros. A elevada popularidade de CAM se deve a uma série de questões relacionadas à segurança, eficácia e custo-efetividade (POSADZKI et al., 2013).

O papel dos fitoestrógenos e do seu possível efeito protetor em distúrbios relacionados a hormônios e doenças como osteoporose, câncer de próstata e mama, complicações cardiovasculares e síndrome da pós-menopausa tem sido amplamente estudado (MICHEL et al., 2013).

Os fitoestrógenos podem ser definidos como compostos naturais não esteroidais, geralmente constituintes de plantas ou seus metabólitos, que induzem respostas biológicas em mamíferos, mimetizando ou modulando a ação de estrógenos endógenos (MICHEL et al., 2013).

A definição clássica de fitoestrógenos refere-se a compostos que exercem efeitos estrogênicos sobre o SNC, estimulando o crescimento do trato genital de fêmeas. No entanto, o termo pode ser utilizado num sentido mais amplo, referindo-se a produtos com efeito sugestivos de estrogenicidade, como por exemplo, a ligação ao receptor de estrogênio. São divididos em três classes principalmente: isoflavonas, cumestanos e lignanas. Todos são compostos difenólicos com estruturas semelhantes aos estrógenos naturais e sintéticos e aos antiestrógenos (KURZER & XU, 1997).

Alguns estudos com fitoestrogênios demonstraram a atuação dos mesmos em lipoproteínas (DEWELL et al., 2002) e no tratamento de doenças cardiovasculares (ALBERTAZZI & PURDIE, 2008).

Acreditam-se amplamente nas ações preventivas e terapêuticas dos fitoestrogênios em relação à aterosclerose, carcinogênese e osteoporose (PATISAUL & JEFFERSON, 2010).

Mulheres na menopausa possuem risco aumentado para doença arterial coronariana e este aumento ocorre devido a mudanças no metabolismo de lipoproteínas, justificado pela perda de secreção endógena de estrógenos. Também há aumento das lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e diminuição de lipoproteínas de alta densidade (HDL). Evidências na literatura sugerem que o consumo de fitoestrógenos, devido a sua similaridade química ao estrógeno endógeno, é responsável por diminuir estes fatores de risco (DEWELL et al., 2002).

Embora a estrutura química dos fitoestrógenos seja semelhante a dos hormônios esteroidais, seus efeitos são estimados em serem milhares de vezes mais fracos que os do  $17\beta$ -estradiol. Dependendo da concentração, os fitoestrógenos podem competir com o estradiol pela ligação ao receptor e também podem inibir enzimas, como a proteína quinase e tirosina quinase, contribuindo para os efeitos clínicos, entre eles, o efeito anti-proliferativo. Podem agir como agonistas e antagonistas de estrógeno (ALBERTAZZI & PURDIE, 2008).

Embora numerosos estudos clínicos e epidemiológicos já tenham avaliado a relação entre o consumo de fitoestrógenos e evolução das doenças humanas, os resultados ainda não são claros quanto à possibilidade de estes compostos terem potencial terapêutico (PATISAUL & JEFFERSON, 2010).

Um dos ensaios que permite identificar substâncias interferentes na ação dos endócrinos no organismo é o *Recombinant Yeast Assay* (RYA), que utiliza leveduras recombinantes. Este ensaio utiliza uma levedura *Saccharomyces cerevisiae* geneticamente modificada que contém um gene que codifica receptor de estrógenos humanos e um plasmídeo que codifica a enzima  $\beta$ -galactosidase de *Escherichia coli*. Na presença de um composto com atividade estrogênica, ele se liga ao receptor e a enzima  $\beta$ -galactosidase é produzida. Adiciona-se um substrato para esta enzima 4-metilumbeliferona - $\beta$ -D galactopiranosídeo (MUGAL) e é possível analisar o

resultado através de fluorescência. Os resultados são expressos em equivalentes de estradiol (GARCIA-REYERO et al., 2001).

Outro ensaio que permite avaliar o potencial estrogênico é o E-screen. Este é um ensaio proliferativo que avalia estrogenicidade pela indução do aumento de células de câncer de mama MCF-7 e é reconhecido como equivalente biológico para o aumento da atividade mitótica no endométrio de roedores (um dos métodos utilizados em animais para determinar se um composto é estrogênico). Assim, o E-screen foi desenvolvido baseando-se no fato que o soro humano inibe a proliferação de células sensíveis a estrógenos e que estrógenos que induzem a proliferação celular anulam este efeito inibitório. Assim, esteróides não estrogênicos e fatores de crescimento não anulam a inibição proliferativa do soro de mamíferos. É um teste quantitativo, que compara o crescimento celular entre células de MCF-7 na ausência de estrógenos (controle negativo), tratadas com 17  $\beta$ -estradiol (controle positivo) e diversas concentrações da amostra suspeita a ter atividade estrogênica (SOTO et al., 1995).

## 2. Objetivos

### 2.1. Objetivo Geral

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a mutagenicidade, antimutagenicidade e estrogenicidade dos extratos etanólicos padronizados (70%) de quatro espécies do gênero *Byrsonima*: *B. verbascifolia*, *B. coccolobifolia*, *B. correifolia* e *B. ligustrifolia*.

### 2.2. Objetivos específicos

-Avaliar a mutagenicidade, através do Teste de Ames, dos extratos etanólicos padronizados de *B. verbascifolia*, *B. coccolobifolia*, *B. correifolia* e *B. ligustrifolia* empregando as linhagens TA100, TA98, TA97a e TA102 de *S. typhimurium*.

-Avaliar a antimutagenicidade, através do Teste de Ames, apenas para as amostras consideradas negativas para mutagenicidade, (*B. verbascifolia*, *B. correifolia*) nas linhagens TA100, TA98 e TA102 de *S. typhimurium*.

-Avaliar a estrogenicidade, através do teste RYA, dos extratos etanólicos padronizados de *B. verbascifolia*, *B.coccolobifolia*, *B. correifolia* e *B. ligustrifolia*.

-Avaliar a estrogenicidade através do ensaio de proliferação celular E-screen dos extratos etanólicos pradonizados de *B. verbascifolia*, *B.coccolobifolia*, *B. correifolia* e *B. ligustrifolia*

### 3. Materiais e Métodos

#### 3.1. Obtenção dos extratos

Os extratos padronizados foram obtidos no Instituto de Química da UNESP, campus Araraquara-SP, sob a coordenação do Prof. Dr. Wagner Vilegas.

##### 3.1.1 Coleta, caracterização e preparo do material vegetal

As folhas de *B. verbascifolia* foram coletadas no município de Porto Nacional – TO (10°09'41" S e 48° 14' 11"W). A identificação foi feita pelo Dr. Eduardo Ribeiro dos Santos e catalogadas com exsicata nº. 481 e devidamente depositadas no Herbário da Universidade Federal do Tocantins.

As folhas das espécies e *B. ligustrifolia* foram coletadas no município de Pratânia-SP (22°15' 54" S e 47°47' 49" W) em janeiro de 2006 pelo Dr. Luiz Fernando R. de Almeida e autenticadas por José Clemente Campos do Instituto de Biociências da UNESP Botucatu (SP) e foram catalogadas na exsicata de número 24164.

A espécie *B. coccolobifolia* foi coletada no município de Itirapina-SP, na localidade de Cerrado de Graúna (22°15' 54" S e 47°47' 49" W), sendo a identificação realizada pelo Prof. Dr. Jorge Tamashiro (IB-UNICAMP), e exsicatas foram depositadas no herbário da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) sob o número 1397.

As folhas de *B. correifolia* foram coletadas por José de Sousa Lima Neto, no município de José de Freitas (PI), Eco Resort Nazareth (latitude 04°48' 4,8" S e longitude 42°37'59,1" W) sendo sua exsicata depositada o herbário Graziella Barroso da Universidade Federal do Piauí com o número 27151.

As folhas foram separadas de outras partes aéreas das plantas, secas em estufa a 40° C até que as mesmas apresentassem massa constante. Posteriormente

foram trituradas em moinho de facas e armazenadas em ambiente ao abrigo da luz e com climatização adequada para uso futuro.

### **3.1.2 Preparo dos extratos**

Para o preparo dos extratos, foi utilizado como solvente extrator Etanol/ Água (7:3 v/v) e percolador de aço inox (20 L) conforme Farmacopéia Brasileira (Brasil, 2010). Os pós das folhas das espécies de *Byrsonima* foram previamente intumescidos por 2 horas antes do empacotamento no percolador, com a proporção solvente : pó vegetal correspondia de 5:1. A percolação deu-se em fluxo moderado de 2 mL/min/Kg.

O solvente do extrato foi eliminado em rotaevaporador modelo Laborota 4001 – efficient, marca Heidolph®, equipado com bomba de pressão reduzida modelo Rotavac valve control Heidolph®. O resíduo de água do extrato foi eliminado com uso de liofilizador da marca Savant Instruments INC., modelo Micro Modulo. O extrato seco foi triturado no graal e armazenado em frasco âmbar a 4 °C.

## **3.2. Avaliação da Mutagenicidade pelo Teste de Ames**

O teste empregado para avaliação da atividade mutagênica das amostras foi o teste de Ames com *Salmonella typhimurium* (MARON & AMES, 1983).

### **3.2.1 Linhagens**

Foram utilizadas as linhagens TA98, TA97a, TA100 e TA102 de *S. typhimurium* gentilmente cedidas pelo Dr. Bruce Ames da Universidade de Berkeley, Califórnia, USA.

### **3.2.2. Controles**

O controle negativo foi feito com dimetilsulfóxido (DMSO), solvente das amostras. Os controles positivos, para os ensaios sem ativação metabólica foram NPD para as linhagens TA98 e TA97a, azida sódica (AZS) para a linhagem TA100 e MMC para a linhagem TA102. Para os ensaios com ativação metabólica foram

usados o 2-aminoantraceno (2-AA) para as linhagens TA98, TA100 e TA97a e 2-aminofluoreno (2-AF) para a linhagem TA102.

### 3.2.3. Realização do Ensaio

A metodologia utilizada foi a de pré-incubação, onde adicionou-se 100 µL de cultura de bactérias de concentração  $1-2 \times 10^9$  células/mL (realizada a partir de inóculo realizado com três alçadas de estoque de bactérias armazenadas a  $-80^\circ\text{C}$  e caldo nutriente, a  $37^\circ\text{C}$ , 160rpm/14h) em tubos de ensaio com 500 µL de tampão pH 7,4 (ou fração S9 nos ensaios com ativação metabólica) e concentrações dos extratos pré-determinadas em ensaios de citotoxicidade (para determinar a máxima concentração que pode ser utilizada sem ser tóxica a linhagem) da amostra. O controle negativo foi feito com 500 µL de tampão ou fração S9, 100 µL de DMSO e 100 µL de cultura. O controle positivo foi feito com 500 µL de tampão ou fração S9, 50 µL do mutágeno específico para a linhagem e 100 µL de cultura. Incubou-se a  $37^\circ\text{C}$ , por 20 minutos, e adicionou-se ágar de superfície (Top Ágar) enriquecido com solução de histidina-biotina. Após homogeneização em vórtex, o conteúdo foi vertido em placas com ágar mínimo glicosilado, preparadas previamente. Incubou-se à 48h por  $37^\circ\text{C}$  e contaram-se as colônias manualmente. Foram realizados testes com e sem ativação metabólica para todas as linhagens e os testes foram realizados em triplicata, com cinco concentrações de cada amostra. Para *B. verbascifolia* as concentrações utilizadas foram de 0,2-16,7 mg/placa; para *B. correifolia* 0,52-16,7 mg/placa; para *B. coccolobifolia* 0,52-16 mg/placa e para *B. ligustrifolia* 0,02-18 mg/placa.

### 3.2.4 Análise dos resultados

Os resultados foram avaliados através do programa estatístico Salanal (do Research Triangle Institute, RTP, Carolina do Norte, EUA), adotando o modelo de Bernstein et al., (1982), onde os dados (revertentes/ placa) foram avaliados pela análise de variância (ANOVA), seguido de uma regressão linear. A concentração do composto foi expressa em unidade de massa/placa. A razão de mutagenicidade (RM) foi calculada para cada concentração testada, conforme fórmula abaixo:

$$RM = \frac{\text{Número de revertentes/placa da amostra teste}}{\text{Número de revertentes/placa do controle negativo}}$$

A amostra foi considerada mutagênica quando houve aumento significativo do número de revertentes induzidos e a RM foi maior ou igual a dois em pelo menos uma das concentrações testadas (MORTELMANS & ZEIGER, 2000).

### **3.3. Avaliação da antimutagenicidade pelo Teste de Ames**

As amostras que foram negativas para o teste de mutagenicidade foram submetidas ao teste de antimutagenicidade. O teste empregado para avaliação da atividade anti-mutagênica foi uma variação do teste de Ames com *Salmonella typhimurium* (MARON & AMES, 1983). A diferença é que toda amostra testada é incubada com um mutágeno conhecido. Os resultados, então, expressam porcentagem de inibição, ou seja, a capacidade dos compostos em inibir a ação do agente mutagênico conhecido.

#### **3.3.1 Linhagens**

Utilizou-se as linhagens TA98, TA100 e TA102.

#### **3.3.2 Controles**

O controle negativo foi feito com DMSO (solvente das amostras). Os controles positivos utilizados foram: NPD (para linhagem TA98), MMC (para a linhagem TA102), AFB<sub>1</sub> (para a linhagem TA100) e B[a]P (para a linhagem TA98). AFB<sub>1</sub> e B[a]P são mutágenos indiretos, necessitando assim, de ensaio com ativação metabólica, enquanto NPD e MMC são mutágenos diretos.

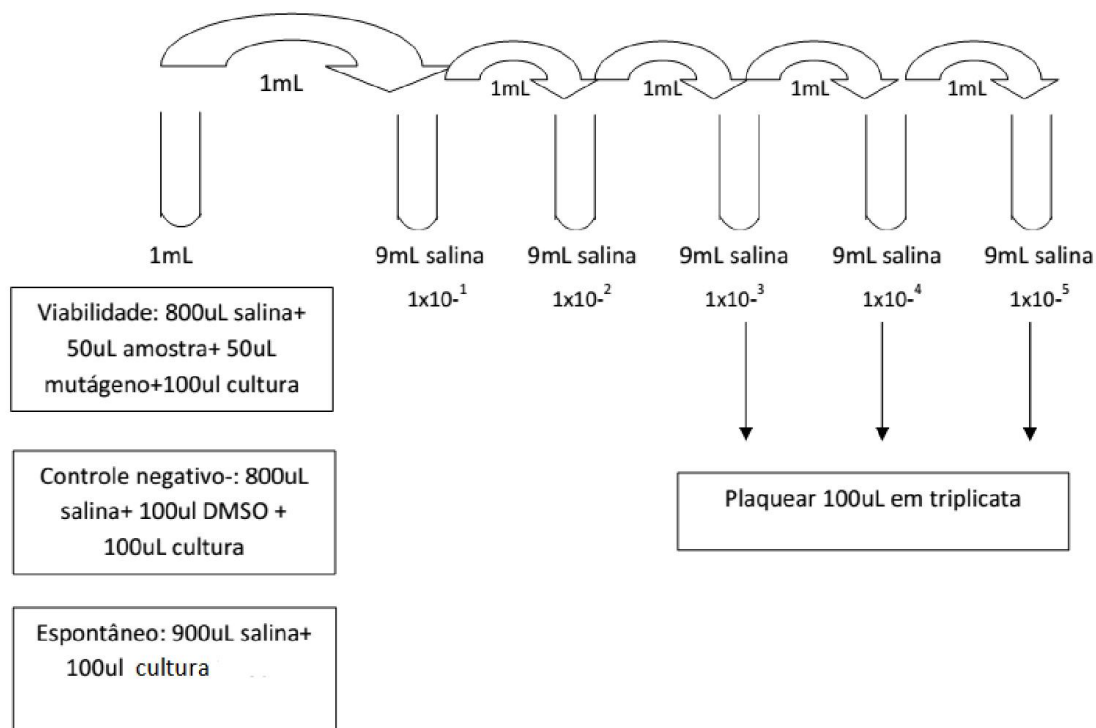
#### **3.3.3. Ensaio de Viabilidade Celular**

Antes de realizar o ensaio de antimutagenicidade foi necessário realizar o teste de viabilidade, para avaliar o possível efeito bactericida dos mutágenos e associações. O procedimento foi o mesmo para o teste de Ames, onde foram



realizados controle negativo (bactéria + DMSO), controle espontâneo (bactéria + tampão) e controle de viabilidade (mutágeno + amostra a ser testada + bactéria).

Para o controle de viabilidade adicionou-se em um tubo de ensaio: 800 µL de salina 8,5%, 50 µL da substância teste, 50 µL de mutágeno e 100 µL de cultura de bactéria, preparada como descrito no ensaio de mutagenicidade. Para o controle negativo, adicionou-se em um tubo de ensaio 800 µL de salina 8,5%, 100 µL de DMSO e 100 µL de cultura de bactérias. Para o controle espontâneo, adicionou-se 900 µL de salina 8,5% e 100 µL de cultura de bactérias (Para o controle de mutágenos indiretos, substituiu-se a salina por fração S9). Incubou-se a 37°C por 20 minutos. Homogeneizou-se em vórtex, flambou-se e verteu-se em outro tubo de ensaio contendo 9 mL de salina. A partir daí realizou-se diluições seriadas na razão 1:10 até que se atingisse a diluição  $1 \times 10^{-5}$ , conforme se visualiza na Figura 2. Plaqueou-se em placas com Agar nutriente (previamente preparadas), em triplicata, 100 µL das últimas três diluições, de cada controle, com alça de Drigalsky, até a secagem. Incubou-se a 37°C durante 24h. Decorrido este período, as colônias foram contadas e calculadas as unidades formadoras de colônias (UFC)/mL. O percentual de viabilidade para cada tratamento foi comparado com o número de colônias do controle negativo. As respostas foram consideradas citotóxicas quando o porcentual de sobrevivência da amostra foi inferior a 80% do total observado para o controle negativo. Este teste é necessário para determinar a concentração a ser utilizada no teste de antimutagenicidade evitando a obtenção de resultados falso-positivos em decorrência de toxicidade.



**Figura 2.** Esquema sobre diluições seriadas do teste de Viabilidade celular.

### 3.3.4 Realização do Ensaio

Adicionou-se 100  $\mu\text{L}$  de cultura de bactérias de concentração  $1-2 \times 10^9$  células/mL em tubos de ensaio com 500  $\mu\text{L}$  de tampão pH 7,4 (ou fração S9 nos ensaios com ativação metabólica) e 50  $\mu\text{L}$  de concentrações pré-determinadas em ensaios de citotoxicidade da amostra associada a 50  $\mu\text{L}$  do mutágeno. O controle negativo foi feito com 500  $\mu\text{L}$  de tampão ou fração S9, 100  $\mu\text{L}$  de DMSO e 100  $\mu\text{L}$  de cultura. O controle positivo foi feito com 500  $\mu\text{L}$  de tampão ou fração S9, 50  $\mu\text{L}$  do mutágeno específico para a linhagem e 100  $\mu\text{L}$  de cultura. Incubou-se a  $37^\circ\text{C}$ , por 20 minutos, e adicionou-se ágar de superfície (Top Agar) enriquecido com solução de histidina-biotina. Após homogeneização em vórtex, o conteúdo foi vertido em placas com ágar mínimo glicosilado, preparadas previamente. Incubou-se à 48h por  $37^\circ\text{C}$  e contaram-se as colônias manualmente. Os testes foram realizados em triplicata,

com cinco concentrações de cada amostra. Para *B. verbascifolia*, as concentrações utilizadas variaram de 0,0125-2 mg/placa e para *B. correifolia* 0,0078- 4 mg/placa.

### **3.3.5. Análise dos resultados**

Os resultados dos ensaios de antimutagenicidade foram expressos em porcentagem de inibição, ou seja, a capacidade dos extratos para inibir a ação do agente mutagênico conhecido. O cálculo da porcentagem da inibição da mutagenicidade foi realizado de acordo com Loh et al. (2009) onde o percentual de inibição =  $100 - [(T/M) \times 100]$ , em que T é a média do número de revertentes/placa das placas contendo mutágeno e substância teste, e M é a média do número de revertentes/placa das placas contendo apenas o mutágeno.

Considerou-se ausência de efeito antimutagênico quando o percentual de inibição foi inferior a 25%; efeito moderado quando o percentual de inibição estava entre 25% e 40% e, como forte antimutagenicidade quando o percentual de inibição foi superior a 40% (NEIGI et al., 2003; LIRA et al., 2008).

Os resultados também foram analisados pelo software estatístico GraphPad Prism 5. Os dados (revertentes/placa) foram avaliados por análise da variância (One-way ANOVA), seguido por Tukey.

## **3.4. Avaliação da estrogenicidade pelo Teste RYA**

O RYA foi realizado como descrito em Garcia-Reyero et al., (2007).

### **3.4.1. Linhagem utilizada**

A linhagem utilizada foi BY4741, obtida da EUROSCARF, Alemanha e gentilmente cedida pelo Dr. Benjamin Piña, do CSIC, Barcelona, Espanha.

### **3.4.2 Controles utilizados**

Como controle negativo utilizou-se DMSO (solvente da amostra) a 10%. O controle positivo utilizado foi 17- $\beta$ -estradiol na concentração final de 10 nM e o

controle de citotoxicidade foi realizado com a associação da amostra utilizada e 17- $\beta$ -estradiol.

### 3.4.3 Realização do ensaio

A levedura BY4741 transformada, depois de descongelada do estoque, foi repicada em placa com meio mínimo e incubada a 30°C, por 2-3 dias. A seguir, após isolamento, uma colônia de levedura foi colocada em 3 mL de meio rico *Yeast Nitrogen Base* (YPD), overnight, a 30°C e 120 rpm. Inoculou-se, então, 10  $\mu$ L da cultura anterior em 30 mL de meio mínimo, o qual foi incubado a 30°C até atingir densidade ótica ( $D.O_{600nm}$ ) igual a 0,1 (aproximadamente 14 horas).

As amostras foram dissolvidas em DMSO e colocadas em microplacas de 96 orifícios, previamente siliconadas, em triplicata. Foram feitos também controles negativo (solvente da amostra), positivo (17 $\beta$ -estradiol) e controles de toxicidade. Em cada orifício foram adicionados 50  $\mu$ L da cultura de levedura.

As amostras (as concentrações iniciais utilizadas foram 1,25 mg/mL para *B. verbascifolia*, 0,41 mg/mL para *B. correifolia* e para *B.coccolobifolia* e para *B. ligustrifolia* foi 4 mg/mL) foram diluídas seriadamente até 1:810 e em seguida, a microplaca foi incubada por 6 horas a 30°C com agitação a 120 rpm. Posteriormente, adicionou-se tampão de lise e foi novamente incubada nas mesmas condições por mais 30 minutos. A seguir, adicionou-se tampão suplementado com 0,1% de mercaptoetanol e 0,5% da solução de 4-metilumbeliferona  $\beta$ -D-galactopiranosídeo (MuGal).

Após breve centrifugação, as microplacas foram lidas em espectrofluorímetro em comprimentos de onda de 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  $\beta$ -galactosidase foram avaliados pelo aumento das unidades de fluorescência em relação ao tempo, usando o método de regressão linear padrão (CÉSPEDES et al.; 2005) . Este ensaio quantifica a atividade estrogênica, que é calculada como equivalentes em estradiol (EEQ), definido como quantidade de

estradiol (em nanomolar) que induz a mesma resposta que a amostra testada. Uma curva dose-resposta relacionando a atividade da enzima  $\beta$ -galactosidase com a concentração de estradiol é usada para atribuir um valor estradiol-equivalente (EEQ).

Antes do início dos ensaios propriamente ditos foram realizados ensaios de toxicidade para determinar a concentração da amostra a ser utilizada. Foram utilizadas amostras com viabilidade celular maior ou igual a 70%. Realizaram-se pelo menos três experimentos independentes.

Para *B. verbascifolia* as massas utilizadas de extrato variaram de 0,049-4  $\mu$ g; para *B. correirolia* e *B. coccolobifolia* variaram de 0,025 – 2,08  $\mu$ g e para *B. ligustrifolia* variaram de 0,24-20  $\mu$ g.

#### 3.4.4 Análise dos Resultados

A análise foi realizada através do Microsoft Excel. A fluorescência foi gravada por 20 minutos (uma medição por minuto) e os valores da atividade da  $\beta$ -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 A420 e A600 representam os valores de absorbância a 420 e 600 nm, respectivamente para cada poço (NOGUEROL et al., 2006).

Os resultados foram dados em EEQ. Para traduzir os resultados em EEQ, a partir das diluições seriadas, assumimos que as curvas dose-resposta hormonais seguem uma função sigmoidal:

$$\frac{R - R_0}{R_{\max} - R_0} = \frac{1}{1 + \frac{K_d}{[L]}}$$

onde  $R_0$  representa as unidades de  $\beta$ -galactosidase obtidas sem ligante (ou substância teste),  $R$  as unidades de  $\beta$ -galactosidase obtidas na concentração do ligante ( $L$ ) e  $R_{\max}$  as unidades de  $\beta$ -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).

Foram consideradas positivas as amostras em que foi possível detectar o EEQ.

Com base em pelo menos três experimentos independentes, realizou-se a média e obteve-se EEQ geral (nM) e seu desvio padrão. Com todas as leituras disponíveis obteve-se um gráfico de cinética mostrando o comportamento das amostras em função do tempo.

Os resultados também foram analisados pelo software estatístico GraphPad Prism 5. Os dados (média das absorbâncias) foram avaliadas por análise da variância (One-way ANOVA), seguido por Tukey. Compararam-se as absorbâncias obtidas no minuto inicial e no minuto final das leituras, além da comparação entre as concentrações e os controles utilizados.

### **3.5 Ensaio de citotoxicidade para E-screen**

O ensaio foi realizado conforme descrito por SOTO et al., (1995) e RASMUSSEN & NIELSEN, (2002).

#### **3.5.1 Linhagem**

A linhagem empregada foi o clone BUS das células MCF-7, gentilmente cedidas pela Dra. Marieta Fernandez da Universidade de Granada-Espanha, é

derivada de câncer de mama humano e responsiva a estrógeno. Encontra-se estocada em nitrogênio líquido, em uma solução de congelamento composta 45% de meio de cultura DMEM, 45% de SBF e 10% de DMSO ou glicerol autoclavado.

Cultivou-se em meio DMEM suplementado com 10% de SBF e repicou-se por tripsinização quando necessário. Mantiveram-se as garrafas em cultura sob condições padronizadas de incubação (37°C, em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de saturação de umidade). Utilizaram-se células entre as terceiras e décimas passagens.

### **3.5.2 Controles**

O controle negativo consistiu em meio de cultura DMEM. O controle positivo foi realizado com 30% de DMSO diluído em DMEM. E o controle de solvente foi realizado com 1% de DMSO (máxima concentração do solvente utilizada no teste).

### **3.5.3 Realização do ensaio**

Transferiu-se 100 µL de suspensão de células tripsinizadas e previamente contadas em câmara hemocitométrica de Neubauer (Boeco, Germany) em placas de 96 orifícios, totalizando,  $2 \times 10^4$  células por orifício. Após 24 horas de aderência o meio de cultura foi removido e lavou-se com 100 µL PBS.

Para cada amostra foram feitos ensaios de citotoxicidade para 24 horas e para 144 horas (6 dias) de incubação. Realizaram-se pelo menos três ensaios independentes para cada amostra em cada situação. Nos ensaios de citotoxicidade de 24 horas utilizou-se meio DMEM sem Soro Bovino Fetal (SBF). No ensaio de citotoxicidade de 144 horas utilizou-se meio DMEM suplementado com 10% de SBF.

Utilizou-se cinco concentrações de cada amostra (previamente dissolvidas em DMSO), que foram submetidas à diluição seriada em meio DMEM em outra placa, para evitar o desprendimento das células, e foram transferidas para a placa com as células aderidas. Utilizou-se as seguintes concentrações de cada amostra: 1mg/poço, 0,5 mg/poço, 0,25 mg/poço, 0,125 mg/poço e 0,625 mg/poço, todas elas

dissolvidas em 100  $\mu$ L de meio DMEM. As concentrações foram pré-determinadas a partir de ensaios preliminares de citotoxicidade. Os ensaios foram realizados em triplicatas para cada controle e cada concentração, além de terem sido realizados três ensaios independentes.

#### **3.5.4 Ensaio colorimétrico da Sulforodamina B**

O ensaio foi realizado conforme descrito por SKEHAN et al., (1990), e RASMUSSEN & NIELSEN, (2002).

Esta técnica se baseia no princípio que o corante se liga a aminoácidos básicos das proteínas celulares e, por avaliação colorimétrica, fornece uma estimativa da massa protéica total, que é relacionada ao número de células vivas que foram fixadas. Após o tempo de incubação, fixaram-se as células com 200  $\mu$ L ácido tricloroacético 10% (para placas de 96 orifícios, ou 500  $\mu$ L quando em placas de 24 orifícios) e incubou-se a 4°C por 1 hora. Lavou-se com água de torneira gelada e esperou-se a secagem das placas a temperatura ambiente. Após, as células foram tratadas com 200  $\mu$ L de solução de sulforodamina B 0,4% em ácido acético 1% (para placas de 96 orifícios, ou 500  $\mu$ L quando em placas de 24 orifícios). Incubou-se por 30 minutos na ausência de luz. Lavou-se com ácido acético 1% até retirar o excesso de corante e esperou-se a secagem das placas. O corante ligado às células foi solubilizado com 200  $\mu$ L de Tris Base 10 mM (pH =10,5) por agitação durante 20 minutos (para placas de 96 orifícios, ou 1 mL quando em placas de 24 orifícios). E, por fim, realizou-se a leitura de absorvância da microploca em leitor de microplacas Synergy<sup>TM</sup> H1, Biotec, em 492 nm. Quando o ensaio realizou-se em placas de 24 orifícios, três alíquotas de 200  $\mu$ L de cada orifício, da placa de 24 poços, foram transferidas para placa de 96 orifícios e realizou-se a leitura conforme descrito.

A absorvância encontrada para o controle de solvente correspondeu ao valor de 100% de sobrevivência. Consideraram-se como citotóxicas as concentrações das amostras que promoveram viabilidade celular inferior a 80%.



Realizou-se análise estatística com os resultados obtidos, pelo software estatístico GraphPad Prism 5 (Graph-Pad Software Inc., San Diego, CA, USA). Realizou-se à análise de variância ANOVA (assumindo  $p < 0,05$ ) seguida pelo pós-teste de Dunnett para comparação com o grupo controle (controle de solvente do teste).

### **3.6 Avaliação da estrogenicidade pelo ensaio de proliferação celular E-screen**

#### **3.6.1 Linhagem**

Idem item 3.5.1

#### **3.6.2 Remoção de estrógenos endógenos do SBF**

Todo meio utilizado no ensaio de E-screen foi suplementado com 10% de SBF livre de estrógenos endógenos. A remoção de estrógenos endógenos foi por meio do tratamento do SBF com carvão-dextrana. A técnica consistiu em incubar 500 mL de soro a 56°C (banho-maria) por 1 hora para a inativação das proteínas plasmáticas. Adicionou-se 25 g de carvão ativado (Sigma Chemical Co, St Louis, MO, USA) a 240 mL de água destilada e aliquoteado em tubos de centrifuga em um volume de 40 mL cada. A suspensão foi submetida à centrifugação (3000 rpm por 10 minutos). Esse procedimento foi repetido 3 vezes com água. Os sobrenadantes de lavagem foram descartados e substituídos pelo mesmo volume de uma solução de dextrana T70 (0,5% do volume total de soro), utilizando os mesmos tubos de centrífuga. Após a centrifugação, descartou-se o sobrenadante e o soro a ser tratado foi adicionado ao carvão-dextrana em cada tubo de centrífuga. A mistura carvão soro foi submetida à incubação a 37°C, sob agitação, por 1 hora. Após centrifugação, o sobrenadante foi esterilizado através de membrana filtrante de 0,22 µm (Millipore) e estocado a -70°C até o momento do uso (SOTO et al., 1995).

#### **3.6.3 Controles**

O controle negativo consistiu em meio de cultura DMEM. O controle positivo foi realizado com  $1 \times 10^{-8}$  M de 17-β-estradiol (a concentração de 17-β-estradiol foi

selecionada com base em uma curva dose-resposta elaborada com concentrações que variaram de  $1 \times 10^{-4}$  M a  $1 \times 10^{-15}$  M, em três replicatas). O controle de solvente foi realizado com 0,2% de DMSO (máxima concentração do solvente utilizada no teste). O meio DMEM foi utilizado na ausência de vermelho de fenol e suplementado com 10% de SBF livre de estrógenos endógenos.

#### **3.6.4 Realização dos ensaios**

O ensaio foi realizado conforme descrito no item 3.5.3, com apenas algumas diferenças. Todo meio DMEM utilizado durante o ensaio era sem vermelho de fenol e suplementado com 10% de SBF livre de estrógenos. O ensaio foi realizado em placa de 24 orifícios e a incubação após o tratamento das células foi de 144 horas (6 dias). Utilizaram-se as mesmas massas de cada amostra do ensaio de citotoxicidade: 1mg/poço, 0,5 mg/poço, 0,25 mg/poço, 0,125 mg/poço e 0,0625 mg/poço, todas elas dissolvidas em 500  $\mu$ L de meio DMEM.

Após 144 horas de incubação, as placas foram submetidas à técnica colorimétrica de sulforodamina B, para avaliar a viabilidade celular (SKEHAN et al.; 1990, RASMUSSEN & NIELSEN, 2002).

O meio DMEM sem vermelho de fenol foi utilizado, pois, foi demonstrado que esse indicador de pH possui propriedades estrogênicas (BERTHOIS et al., 1986).

#### **3.6.5 Ensaio colorimétrico da Sulforodamina**

Idem item 3.5.4

#### **3.6.6 Análise dos Resultados**

Os resultados da atividade estrogênica foram expressos em média e desvio padrão do efeito proliferativo (EP), que estabelece a taxa máxima de proliferação induzida pela substância em células MCF7-BUS. Esse parâmetro é obtido pela razão entre a taxa de proliferação apresentada pela substância avaliada e aquela apresentada pelo controle solvente (0,2% de DMSO):

EP = absorbância do composto/absorbância do controle de solvente

Outro parâmetro analisado foi o efeito proliferativo relativo (EPR), utilizado para comparar a proliferação induzida pelo composto teste com aquela induzida pelo 17- $\beta$ -estradiol, que foi calculado de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{EPR} = (\text{EP}-1) (\text{composto-teste}) / (\text{EP}-1) (17\text{-}\beta\text{-estradiol}) \times 100$$

Quando EPR foi menor que zero, o valor foi desconsiderado.

Os compostos foram considerados agonistas totais quando os valores de EPR foram maiores que 80% em pelo menos uma das concentrações testadas, agonistas parciais entre 25 e 80% e não estrogênicos quando os valores de EPR foram inferiores a 25% (KUCH et al., 2010). Para os cálculos desses parâmetros foram utilizadas fórmulas e funções do Excel (Microsoft, NY, U.S.A.).

Realizou-se também análise estatística com os resultados obtidos, pelo software estatístico GraphPad Prism 5 (Graph-Pad Software Inc., San Diego, CA, USA). Realizou-se à análise de variância ANOVA (assumindo  $p < 0,05$ ) seguida pelo pós-teste de Dunnett para comparação com o grupo controle (controle de solvente do teste).

## 4. Resultados

### 4.1. Avaliação da mutagenicidade

Os resultados da mutagenicidade de *B. verbascifolia* estão apresentados na Tabela 1, *B. correifolia* na Tabela 2, *B. coccolobifolia* na Tabela 3 e *B. ligustrifolia* na Tabela 4 e estão expressos pelo número de revertentes e seus respectivos desvios padrões (DP) e RM, para as quatro linhagens de *S. typhimurium*, na ausência (-S9) e presença (+S9) de ativação metabólica.

Na Tabela 1, que indica os resultados de *B. verbascifolia*, podemos observar que todas as razões de mutagenicidades, para todas as linhagens, foram menores do que 2,0 o que indica que este extrato padronizado não foi mutagênico para nenhuma linhagem utilizada. Tampouco houve relação dose-resposta.

Na Tabela 2, que mostra os resultados de *B. correifolia*, também podemos observar que todas as razões de mutagenicidade são menores do que 2,0 e também não há relação dose-reposta, indicando que este extrato também não é mutagênico.

Na Tabela 3, que apresenta os resultados de *B. coccolobifolia*, pode-se observar razões de mutagenicidade igual ou superior a 2,0 para a linhagem TA98, indicando que este extrato foi mutagênico, tanto na presença e ausência de ativação metabólica. Na linhagem TA97a, somente na presença de ativação metabólica, pode-se observar uma relação dose-resposta e há razão de mutagenicidade igual a 1,9 na maior concentração testada, evidenciando indícios de mutagenicidade.

Na Tabela 4, que representa os resultados de *B. ligustrifolia*, pode-se observar que para a linhagem TA98 (na ausência de ativação metabólica) a razão de mutagenicidade foi igual a 2,0, indicando potencial mutagênico.

**Tabela 1.** Atividade mutagênica avaliada pelo número de revertentes/placa  $\pm$  DP e razão de mutagenicidade (RM) induzida pelo extrato etanólico 70% de *B. verbascifolia*, na presença (+S9) e ausência (-S9) de ativação metabólica, com as cepas TA98, TA100, TA97a e TA102 de *Salmonella typhimurium*

Tratamento (mg/placa)	TA98		Tratamento (mg/placa)	TA100		Tratamento (mg/placa)	TA97a		Tratamento (mg/placa)	TA102	
	- S9	+ S9		- S9	+ S9		- S9	+ S9		- S9	+ S9
<i>Byrsonima verbascifolia</i>											
<b>0,00<sup>a</sup></b>	17 $\pm$ 4	68 $\pm$ 1	<b>0,00<sup>a</sup></b>	113 $\pm$ 16	114 $\pm$ 11	<b>0,00<sup>a</sup></b>	81 $\pm$ 6	121 $\pm$ 20	<b>0,00<sup>a</sup></b>	381 $\pm$ 43	341 $\pm$ 34
<b>2,09</b>	15 $\pm$ 3 (0,9)	67 $\pm$ 2 (1,0)	<b>0,38</b>	91 $\pm$ 8 (0,8)	121 $\pm$ 12(1,1)	<b>0,20</b>	78 $\pm$ 3 (1,0)	137 $\pm$ 16(1,1)	<b>0,38</b>	369 $\pm$ 3 (1,0)	387 $\pm$ 20(1,1)
<b>4,17</b>	24 $\pm$ 6 (1,4)	75 $\pm$ 5 (1,1)	<b>0,75</b>	107 $\pm$ 20 (1,0)	124 $\pm$ 10 (1,1)	<b>0,39</b>	97 $\pm$ 2(1,2)	140 $\pm$ 10(1,2)	<b>0,75</b>	305 $\pm$ 16 (0,8)	445 $\pm$ 32(1,3)
<b>8,35</b>	18 $\pm$ 6 (1,0)	81 $\pm$ 3 (1,2)	<b>1,5</b>	106 $\pm$ 2 (0,9)	99 $\pm$ 4 (0,9)	<b>0,78</b>	117 $\pm$ 2(1,4)	146 $\pm$ 7(1,2)	<b>1,5</b>	368 $\pm$ 36 (1,0)	353 $\pm$ 29(1,0)
<b>12,53</b>	23 $\pm$ 3 (1,3)	61 $\pm$ 4 (0,9)	<b>2,25</b>	105 $\pm$ 4 (0,9)	104 $\pm$ 5 (0,9)	<b>1,12</b>	109 $\pm$ 6 (1,3)	166 $\pm$ 12(1,4)	<b>2,25</b>	322 $\pm$ 45 (0,9)	344 $\pm$ 45(1,0)
<b>16,70</b>	29 $\pm$ 12 (1,7)	50 $\pm$ 1 (0,7)	<b>3,00</b>	110 $\pm$ 9,10 (1,0)	93 $\pm$ 3 (0,8)	<b>1,56</b>	94 $\pm$ 5 (1,2)	169 $\pm$ 39(1,4)	<b>3,00</b>	373 $\pm$ 11 (1,0)	350 $\pm$ 27(1,0)
<b>Controle +</b>	720 $\pm$ 28 <sup>b</sup>	500 $\pm$ 32 <sup>c</sup>	<b>Controle +</b>	1375 $\pm$ 35 <sup>d</sup>	1387 $\pm$ 37 <sup>c</sup>	<b>Controle +</b>	1115 $\pm$ 25 <sup>b</sup>	1450 $\pm$ 70 <sup>c</sup>	<b>Controle +</b>	1468 $\pm$ 53 <sup>e</sup>	1403 $\pm$ 33 <sup>f</sup>

<sup>a</sup>Controle Negativo: DMSO, 100  $\mu$ L/placa; Controle +: <sup>b</sup>NPD, 10  $\mu$ g/placa; <sup>c</sup> 2-AA, 1,5  $\mu$ g/placa; <sup>d</sup>AZS, 2,5  $\mu$ g/placa, <sup>e</sup>MMC, 0,5  $\mu$ g/placa; <sup>f</sup>2-AF, 5,0  $\mu$ g/placa

**Tabela 2.** Atividade mutagênica avaliada pelo número de revertentes/placa  $\pm$  DP e razão de mutagenicidade (RM) induzida pelo extrato etanólico 70% de *B. correifolia*, na presença (+S9) e ausência (-S9) de ativação metabólica, com as cepas TA98, TA100, TA97a e TA102 de *Salmonella typhimurium*

Tratamento (mg/placa)	TA98		Tratamento (mg/placa)	TA100		Tratamento (mg/placa)	TA97a		Tratamento (mg/placa)	TA102	
	- S9	+ S9		- S9	+ S9		- S9	+ S9		- S9	+ S9
<i>Byrsonima correifolia</i>											
<b>0,00<sup>a</sup></b>	20 $\pm$ 4	68 $\pm$ 1	<b>0,00<sup>a</sup></b>	93 $\pm$ 6	114 $\pm$ 11	<b>0,00<sup>a</sup></b>	172 $\pm$ 2	99 $\pm$ 1	<b>0,00<sup>a</sup></b>	352 $\pm$ 30	435 $\pm$ 43
<b>2,09</b>	16 $\pm$ 3 (0,8)	86 $\pm$ 6 (1,3)	<b>0,52</b>	73 $\pm$ 3 (0,8)	103 $\pm$ 5 (0,9)	<b>0,52</b>	185 $\pm$ 6 (1,1)	85 $\pm$ 4 (0,9)	<b>0,52</b>	397 $\pm$ 11 (1,1)	608 $\pm$ 45(1,4)
<b>4,17</b>	18 $\pm$ 2 (0,9)	80 $\pm$ 3 (1,2)	<b>1,04</b>	90 $\pm$ 10 (1,0)	106 $\pm$ 8 (0,9)	<b>1,04</b>	165 $\pm$ 11 (1,0)	123 $\pm$ 11 (1,3)	<b>1,04</b>	386 $\pm$ 33 (1,1)	564 $\pm$ 35 (1,3)
<b>8,35</b>	27 $\pm$ 3 (1,3)	66 $\pm$ 6 (1,0)	<b>2,09</b>	93 $\pm$ 8 (1,0)	96 $\pm$ 9 (0,8)	<b>2,09</b>	166 $\pm$ 18 (1,0)	135 $\pm$ 4 (1,4)	<b>2,09</b>	413 $\pm$ 16 (1,2)	484 $\pm$ 33 (1,1)
<b>12,53</b>	37 $\pm$ 10 (1,8)	62 $\pm$ 3 (0,9)	<b>3,13</b>	94 $\pm$ 11(1,0)	115 $\pm$ 12 (1,0)	<b>3,13</b>	186 $\pm$ 5 (1,1)	110 $\pm$ 4 (1,1)	<b>3,13</b>	333 $\pm$ 50 (1,0)	354 $\pm$ 38 (0,8)
<b>16,70</b>	31 $\pm$ 6(1,5)	60 $\pm$ 9 (0,9)	<b>4,17</b>	65 $\pm$ 6 (0,7)	94 $\pm$ 4 (0,8)	<b>4,17</b>	143 $\pm$ 10 (0,8)	134 $\pm$ 5 (1,4)	<b>4,17</b>	285 $\pm$ 21 (0,8)	322 $\pm$ 32(0,7)
<b>Controle +</b>	730 $\pm$ 28 <sup>b</sup>	500 $\pm$ 32 <sup>c</sup>	<b>Controle +</b>	1250 $\pm$ 35 <sup>d</sup>	700 $\pm$ 37 <sup>c</sup>	<b>Controle +</b>	950 $\pm$ 25 <sup>b</sup>	1450 $\pm$ 70 <sup>c</sup>	<b>Controle +</b>	1468 $\pm$ 53 <sup>e</sup>	1403 $\pm$ 33 <sup>f</sup>

<sup>a</sup>Controle Negativo: DMSO, 100  $\mu$ L/placa; Controle +: <sup>b</sup>NPD, 10  $\mu$ g/placa; <sup>c</sup> 2-AA, 1,5  $\mu$ g/placa; <sup>d</sup>AZS, 2,5  $\mu$ g/placa, <sup>e</sup>MMC, 0,5  $\mu$ g/placa; <sup>f</sup>2-AF, 5,0  $\mu$ g/placa

**Tabela 3.** Atividade mutagênica avaliada pelo número de revertentes/placa  $\pm$  DP e razão de mutagenicidade (RM) induzida pelo por extrato etanólico 70% de *B. coccolobifolia*, na presença (+S9) e ausência (-S9) de ativação metabólica, com as cepas TA98, TA100, TA97a e TA102 de *Salmonella typhimurium*

Tratamento (mg/placa)	TA98		Tratamento (mg/placa)	TA100		Tratamento (mg/placa)	TA97a		Tratamento (mg/placa)	TA102	
	- S9	+ S9		- S9	+ S9		- S9	+ S9		- S9	+ S9
<i>Byrsonima coccolobifolia</i>											
<b>0,00<sup>a</sup></b>	37 $\pm$ 8	24 $\pm$ 4	<b>0,00<sup>a</sup></b>	112 $\pm$ 13	92 $\pm$ 9	<b>0,00<sup>a</sup></b>	172 $\pm$ 2	123 $\pm$ 15	<b>0,00<sup>a</sup></b>	406 $\pm$ 11	341 $\pm$ 34
<b>2,0</b>	56 $\pm$ 3*(1,5)	56 $\pm$ 6**(2,3)	<b>0,52</b>	115 $\pm$ 10 (1,0)	102 $\pm$ 12(1,1)	<b>0,52</b>	129 $\pm$ 15 (0,7)	144 $\pm$ 11 (1,2)	<b>0,52</b>	345 $\pm$ 8(0,9)	386 $\pm$ 17(1,1)
<b>4,0</b>	61 $\pm$ 8* (1,7)	51 $\pm$ 1**(2,1)	<b>1,04</b>	135 $\pm$ 18 (1,2)	115 $\pm$ 7(1,3)	<b>1,04</b>	145 $\pm$ 10 (0,8)	163 $\pm$ 11(1,3)	<b>1,04</b>	338 $\pm$ 13(0,8)	466 $\pm$ 12 (1,4)
<b>8,0</b>	70 $\pm$ 9*(1,9)	67 $\pm$ 13*(2,8)	<b>2,09</b>	154 $\pm$ 25 (1,4)	110 $\pm$ 11(1,2)	<b>2,09</b>	175 $\pm$ 15 (1,0)	208 $\pm$ 29* (1,7)	<b>2,09</b>	350 $\pm$ 23(0,9)	330 $\pm$ 24(1,0)
<b>12,00</b>	102 $\pm$ 10**(2,8)	64 $\pm$ 9**(2,6)	<b>3,13</b>	170 $\pm$ 14 (1,5)	108 $\pm$ 8(1,2)	<b>3,13</b>	214 $\pm$ 5 (1,2)	215 $\pm$ 13**(1,8)	<b>3,13</b>	355 $\pm$ 13(0,9)	297 $\pm$ 8(0,9)
<b>16,00</b>	67 $\pm$ 10*(1,9)	63 $\pm$ 13*(2,6)	<b>4,17</b>	143 $\pm$ 27 (1,3)	115 $\pm$ 18(1,3)	<b>4,17</b>	190 $\pm$ 7 (1,1)	237 $\pm$ 34*(1,9)	<b>4,17</b>	358 $\pm$ 10(0,9)	261 $\pm$ 2(0,8)
<b>Controle +</b>	531 $\pm$ 28 <sup>b</sup>	500 $\pm$ 30 <sup>c</sup>	<b>Controle +</b>	1375 $\pm$ 35 <sup>d</sup>	700 $\pm$ 38 <sup>c</sup>	<b>Controle +</b>	1115 $\pm$ 25 <sup>b</sup>	700 $\pm$ 30 <sup>c</sup>	<b>Controle +</b>	1143 $\pm$ 28 <sup>e</sup>	1403 $\pm$ 33 <sup>f</sup>

<sup>a</sup>Controle Negativo: DMSO, 100  $\mu$ L/placa; Controle +: <sup>b</sup>NPD, 10  $\mu$ g/placa; <sup>c</sup> 2-AA, 1,5  $\mu$ g/placa; <sup>d</sup>AZS, 2,5  $\mu$ g/placa, <sup>e</sup>MMC, 0,5  $\mu$ g/placa; <sup>f</sup>2-AF, 5,0  $\mu$ g/placa. \* p<0,05, \*\*p<0,01 ANOVA

**Tabela 4.** Atividade mutagênica avaliada pelo número de revertentes/placa  $\pm$  DP e razão de mutagenicidade (RM) induzida pelo extrato etanólico 70% de *B. ligustrifolia*, na presença (+S9) e ausência (-S9) de ativação metabólica, com as cepas TA98, TA100, TA97a e TA102 de *Salmonella typhimurium*

Tratamento (mg/placa)	TA98		Tratamento (mg/placa)	TA100		Tratamento (mg/placa)	TA97a		Tratamento (mg/placa)	TA102	
	- S9	+ S9		- S9	+ S9		- S9	+ S9		- S9	+ S9
<i>Byrsonima ligustrifolia</i>											
<b>0,00<sup>a</sup></b>	18 $\pm$ 3	24 $\pm$ 4	<b>0,00<sup>a</sup></b>	210 $\pm$ 33	87 $\pm$ 15	<b>0,00<sup>a</sup></b>	110 $\pm$ 9	115 $\pm$ 1	<b>0,00<sup>a</sup></b>	262 $\pm$ 25	407 $\pm$ 30
<b>2,25</b>	21 $\pm$ 1 (1,2)	22 $\pm$ 5(0,9)	<b>0,08</b>	226 $\pm$ 13 (1,1)	114 $\pm$ 13(1,3)	<b>0,16</b>	106 $\pm$ 5 (1,0)	132 $\pm$ 12(1,2)	<b>0,02</b>	330 $\pm$ 16 (1,3)	379 $\pm$ 45(0,9)
<b>4,50</b>	22 $\pm$ 1 (1,3)	27 $\pm$ 8 (1,1)	<b>0,16</b>	211 $\pm$ 12 (1,0)	98 $\pm$ 6(1,1)	<b>0,31</b>	109 $\pm$ 8(1,0)	136 $\pm$ 8(1,2)	<b>0,04</b>	232 $\pm$ 2 (0,9)	382 $\pm$ 21(0,9)
<b>9,00</b>	20 $\pm$ 2 (1,1)	38 $\pm$ 7 (1,6)	<b>0,31</b>	224 $\pm$ 37(1,1)	90 $\pm$ 9 (1,0)	<b>0,62</b>	127 $\pm$ 7(1,2)	132 $\pm$ 19(1,2)	<b>0,08</b>	244 $\pm$ 25 (0,9)	411 $\pm$ 20(1,0)
<b>13,50</b>	35 $\pm$ 6* (2,0)	34 $\pm$ 9 (1,4)	<b>0,47</b>	227 $\pm$ 24 (1,1)	94 $\pm$ 3 (1,1)	<b>0,94</b>	90 $\pm$ 6 (0,8)	145 $\pm$ 17(1,3)	<b>0,12</b>	243 $\pm$ 22 (0,9)	395 $\pm$ 12(1,0)
<b>18,00</b>	36 $\pm$ 5* (2,0)	32 $\pm$ 2 (1,3)	<b>0,62</b>	209 $\pm$ 11 (1,0)	93 $\pm$ 16 (1,1)	<b>1,25</b>	121 $\pm$ 1 (1,1)	133 $\pm$ 4(1,2)	<b>0,16</b>	258 $\pm$ 11 (1,0)	328 $\pm$ 15(0,8)
<b>Controle +</b>	300 $\pm$ 12 <sup>b</sup>	227 $\pm$ 16 <sup>c</sup>	<b>Controle +</b>	919 $\pm$ 17 <sup>d</sup>	987 $\pm$ 32 <sup>e</sup>	<b>Controle +</b>	1110 $\pm$ 32 <sup>b</sup>	1036 $\pm$ 41 <sup>e</sup>	<b>Controle +</b>	1349 $\pm$ 45 <sup>e</sup>	1464 $\pm$ 43 <sup>f</sup>

<sup>a</sup>Controle Negativo: DMSO, 100  $\mu$ L/placa; Controle +: <sup>b</sup>NPD, 10  $\mu$ g/placa; <sup>c</sup> 2-AA, 1,5  $\mu$ g/placa; <sup>d</sup>AZS, 2,5  $\mu$ g/placa, <sup>e</sup>MMC, 0,5  $\mu$ g/placa; <sup>f</sup>2-AA, 5,0

$\mu$ g/placa. \* p<0,05



## 4.2. Avaliação da antimutagenicidade

Os resultados de *B. verbascifolia* estão apresentados na Tabela 5 e de *B. correifolia* na Tabela 6.

Na Tabela 5, pode-se observar que o extrato de *B.verbascifolia* pode ser considerado como forte antimutagênico frente ao NPD, pois apresentou porcentual de inibição maior que 40% em duas de suas concentrações avaliadas. Frente à MMC, este extrato não apresentou atividade antimutagênica. Quando associado à AFB<sub>1</sub>, as cinco concentrações testadas apresentaram porcentual de inibição maior que 40%, sendo que as concentrações no intervalo de 0,25-2 mg atingiram porcentual de inibição de 91%, podendo ser considerado como forte antimutagênico. Associado ao B[a]P, as cinco concentrações testadas do extrato de *B. verbascifolia* também apresentaram porcentual de inibição maior que 40%, atingindo valor de 82%, classificando-o como forte antimutagênico.

Na Tabela 6, observa-se que *B. correifolia* também apresentou forte potencial antimutagênico frente ao NPD, pois apresentou porcentual de inibição maior que 40% em quatro das cinco concentrações testadas. Frente a MMC, o extrato não foi considerado como antimutagênico. Quando associado à AFB<sub>1</sub>, as cinco concentrações testadas do extrato apresentaram porcentual de inibição maior que 40%, atingindo porcentual de inibição de 80%, podendo-se afirmar que *B. correifolia* apresenta forte atividade antimutagênica. Associadas ao B[a]P, as cinco concentrações do extrato de *B. correifolia* testadas também apresentaram porcentual de inibição de revertentes maior que 40%, sendo o maior porcentual de 83%. Pode-se observar que as diferença entre os percentuais de inibição entre as cinco concentrações avaliadas foram mínimas.

Embora *B.correifolia* não tenha sido considerada como antimutagênica frente a MMC, ela demonstrou um potencial significativo de redução do número de revertentes.

**Tabela 5.** Atividade antimutagênica avaliada pelo número de revertentes/placa  $\pm$  DP e porcentagem de inibição de crescimento de revertentes (%I) por associação de extrato etanólico 70% de *B. verbascifolia*, com mutágenos diretos (NPD e MMC) e indiretos (AFB<sub>1</sub> e B[a]P), com as cepas TA98, TA102 e TA100 de *Salmonella typhimurium*

Mutágenos (M) Linhagem	NPD <sup>b</sup> TA 98 (-S9)		MMC <sup>c</sup> TA 102 (-S9)		AFB <sub>1</sub> <sup>d</sup> TA 100 (+S9)		B[a]P <sup>e</sup> TA 98 (+S9)	
	Tratamento (mg/placa)	N°revertentes $\pm$ DP e (%I)	Tratamento (mg/placa)	N°revertentes $\pm$ DP e (%I)	Tratamento (mg/placa)	N°revertentes $\pm$ DP e (%I)	Tratamento (mg/placa)	N°revertentes $\pm$ DP e (%I)
<i>Byrsonima verbascifolia</i>	0 <sup>a</sup>	18 $\pm$ 4	0 <sup>a</sup>	487 $\pm$ 81	0 <sup>a</sup>	114 $\pm$ 6	0 <sup>a</sup>	36 $\pm$ 5
	0,0125 + M <sup>b</sup>	483 $\pm$ 40** (45)	0,09375 + M <sup>c</sup>	1502 $\pm$ 138 (6)	0,125 + M <sup>d</sup>	213 $\pm$ 7*** (85)	0,04875 + M <sup>e</sup>	102 $\pm$ 24*** (44)
	0,025 + M <sup>b</sup>	454 $\pm$ 60*** (48)	0,1875 + M <sup>c</sup>	1296 $\pm$ 24 (19)	0,25 + M <sup>d</sup>	131 $\pm$ 27*** (91)	0,0975 + M <sup>e</sup>	78 $\pm$ 6*** (57)
	0,05 + M <sup>b</sup>	550 $\pm$ 41** (37)	0,375 + M <sup>c</sup>	1366 $\pm$ 21 (15)	0,5 + M <sup>d</sup>	125 $\pm$ 16*** (91)	0,195 + M <sup>e</sup>	85 $\pm$ 9*** (54)
	0,1 + M <sup>b</sup>	628 $\pm$ 138* (28)	0,75 + M <sup>c</sup>	1380 $\pm$ 4 (14)	1 + M <sup>d</sup>	132 $\pm$ 13*** (91)	0,39 + M <sup>e</sup>	41 $\pm$ 5*** (78)
	0,2 + M <sup>b</sup>	1001 $\pm$ 137 (0)	1,5 + M <sup>c</sup>	1381 $\pm$ 58 (14)	2 + M <sup>d</sup>	132 $\pm$ 24*** (91)	0,78 + M <sup>e</sup>	34 $\pm$ 7*** (82)
	M <sup>b</sup>	876 $\pm$ 30	M <sup>c</sup>	1601 $\pm$ 226	M <sup>d</sup>	1399 $\pm$ 34	M <sup>e</sup>	184 $\pm$ 8

<sup>a</sup>Controle Negativo: DMSO, 100  $\mu$ L/placa; Mutágenos (M): <sup>b</sup>NPD, 20  $\mu$ g/placa; <sup>c</sup>MMC, 0,5  $\mu$ g/placa; <sup>d</sup>AFB<sub>1</sub>, 0,5  $\mu$ g/placa; <sup>e</sup>B[a]P, 1 $\mu$ g/placa. \* p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,0001 ANOVA

**Tabela 6.** Atividade antimutagênica avaliada pelo número de revertentes/placa  $\pm$  DP e porcentagem de inibição de crescimento de revertentes (%I) por associação de extrato etanólico 70% de *B. correifolia*, com mutágenos diretos (NPD e MMC) e indiretos (AFB<sub>1</sub> e B[a]P, com as cepas TA98, TA102 e TA100 de *Salmonella typhimurium*

Mutágenos (M) Linhagem	NPD <sup>b</sup>		MMC <sup>c</sup>		AFB <sub>1</sub> <sup>d</sup>		B[a]P <sup>e</sup>	
	TA 98 (-S9)		TA 102 (-S9)		TA 100 (+S9)		TA 98 (+S9)	
	Tratamento (mg/placa)	Nºrevertentes $\pm$ DP e (%I)	Tratamento (mg/placa)	Nºrevertentes $\pm$ DP e (%I)	Tratamento (mg/placa)	Nºrevertentes $\pm$ DP e (%I)	Tratamento (mg/placa)	Nºrevertentes $\pm$ DP e (%I)
<i>Byrsonima correifolia</i>	0 <sup>a</sup>	18 $\pm$ 4	0 <sup>a</sup>	464 $\pm$ 48	0 <sup>a</sup>	104 $\pm$ 15	0 <sup>a</sup>	36 $\pm$ 5
	0,0125 + M <sup>b</sup>	440 $\pm$ 57*** (50)	0,03125 + M <sup>c</sup>	1208 $\pm$ 15 (15)	0,0078125 + M <sup>d</sup>	353 $\pm$ 59*** (60)	0,25 + M <sup>e</sup>	34 $\pm$ 6*** (82)
	0,025 + M <sup>b</sup>	426 $\pm$ 2*** (51)	0,0625 + M <sup>c</sup>	1126 $\pm$ 66* (20)	0,015625 + M <sup>d</sup>	248 $\pm$ 38*** (72)	0,5 + M <sup>e</sup>	31 $\pm$ 6*** (83)
	0,05+ M <sup>b</sup>	497 $\pm$ 39*** (43)	0,125 + M <sup>c</sup>	1152 $\pm$ 74* (19)	0,03125 + M <sup>d</sup>	370 $\pm$ 118*** (58)	1 + M <sup>e</sup>	32 $\pm$ 6*** (82)
	0,1+ M <sup>b</sup>	593 $\pm$ 20*** (32)	0,25 + M <sup>c</sup>	1205 $\pm$ 52 (15)	0,0625 + M <sup>d</sup>	180 $\pm$ 57*** (80)	2 + M <sup>e</sup>	31 $\pm$ 5*** (83)
	0,2+ M <sup>b</sup>	521 $\pm$ 61*** (41)	0,5 + M <sup>c</sup>	1129 $\pm$ 146* (20)	0,125 + M <sup>d</sup>	206 $\pm$ 46*** (77)	4 + M <sup>e</sup>	39 $\pm$ 3*** (79)
	M <sup>b</sup>	876 $\pm$ 30	M <sup>c</sup>	1414 $\pm$ 61	M <sup>d</sup>	883 $\pm$ 80	M <sup>e</sup>	184 $\pm$ 8

<sup>a</sup>Controle Negativo: DMSO, 100  $\mu$ L/placa; Mutágenos (M): <sup>b</sup>NPD, 20  $\mu$ g/placa; <sup>c</sup>MMC, 0,5  $\mu$ g/placa; <sup>d</sup>AFB<sub>1</sub>, 0,5  $\mu$ g/placa; <sup>e</sup>B[a]P, 1  $\mu$ g/placa. \* p<0,05, \*\*\*p<0,0001 ANOVA

### 4.3 Avaliação da estrogenicidade pelo Teste RYA

Os resultados para o ensaio RYA estão expressos na Tabela 7, apresentados por EEQ e seu desvio padrão.

Foram realizados pelo menos três ensaios independentes. A concentração inicial utilizada para *B. verbascifolia* foi 1,25 mg/mL, para *B. correifolia* e *B. coccolobifolia* foi 0,41 mg/mL e para *B. ligustrifolia* foi 4 mg/mL (pré-determinadas por ensaios de citotoxicidade).

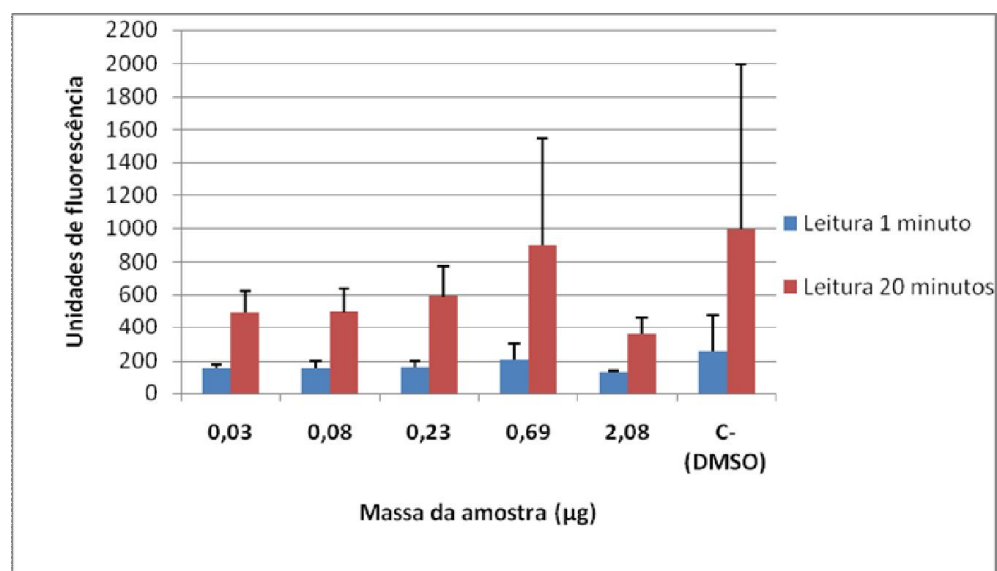
Como se pode observar, as únicas amostras capazes de estimular receptores de estrógenos foram *B. correifolia*, que apresentou EEQ igual a 0,13 nM e *B. ligustrifolia*, que apresentou EEQ igual 0,55. *B. verbascifolia* e *B. coccolobifolia*, para este teste, podem ser consideradas como não estrogênicas, pois possuem valores de EEQ indetectáveis.

Apesar de *B. correifolia* e *B. ligustrifolia* apresentarem EEQ, a análise estatística mostrou que seus resultados não foram significativos. Realizou-se análise estatística, em relação as fluorescências obtidas do primeiro minuto e do vigésimo minuto para uma mesma amostra e com o controle negativo. Também foi feito uma análise estatística em relação à Fluorescência Relativa (atividade máxima da  $\beta$  galactosidade da amostra/atividade máxima da  $\beta$  galactosidade do controle positivo). Nos dois casos, somente houve resultado significativo para o controle positivo (17- $\beta$ -estradiol), como esperado. A significância encontrada foi de  $p < 0,0001$ .

**Tabela 7.** Atividade estrogênica avaliada pelo número de EEQ  $\pm$  DP das amostras *B. verbascifolia*, *B. correifolia*, *B. coccolobifolia* e *B. ligustrifolia*.

Extratos	EEq (nM) $\pm$ DP
<i>B.verbascifolia</i>	0
<i>B. correifolia</i>	0,13 $\pm$ 0,005
<i>B. ligustrifolia</i>	0,55 $\pm$ 0,23
<i>B. coccolobifolia</i>	0

Na Figura 3 é possível observar a atividade da enzima  $\beta$ -galactosidase expressa em unidades de fluorescência média induzida por cada uma das cinco concentrações testadas de extrato de *B. correifolia*, nas primeiras e últimas leituras. Comparando-se com o controle positivo, 17- $\beta$ -estradiol, os valores de fluorescência obtidos pela amostra são baixos. Não houve diferença significativa entre os resultados, com exceção do controle positivo.

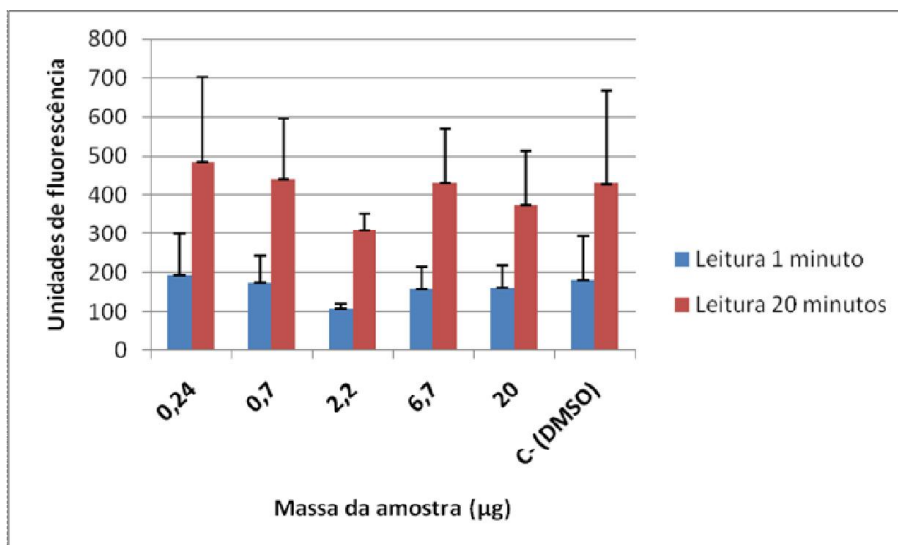


**Figura 3.** Avaliação da atividade da enzima  $\beta$ -galactosidase expressa em unidades de fluorescência média induzida por cada uma das cinco concentrações testadas de extrato de *B. correifolia*, no primeiro minuto e no vigésimo minuto.

Fluorescência do C+: minuto 1:  $4551 \pm 1375^{***}$  minuto 20:  $12778 \pm 2299^{***}$

\*\*\* $p < 0,0001$  ANOVA

Na Figura 4 é possível observar a atividade da enzima  $\beta$ -galactosidase expressa em unidades de fluorescência média induzida por cada uma das cinco concentrações testadas de extrato de *B. ligustrifolia*, nas primeiras e últimas leituras. Comparando-se com o controle positivo, 17- $\beta$ -estradiol, os valores de fluorescência obtidos pela amostra são baixos. Os resultados não foram significativos com exceção do controle positivo



**Figura 4.** Avaliação da atividade da enzima  $\beta$ -galactosidase expressa em unidades de fluorescência média induzida por cada uma das cinco concentrações testadas de extrato de *B. ligustrifolia*, no primeiro minuto e no vigésimo minuto.

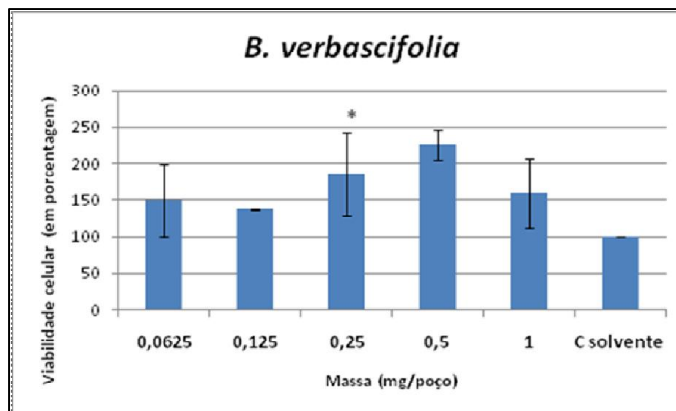
Fluorescência do C+: minuto 1:  $6609 \pm 3260^{***}$  minuto 20:  $14690 \pm 4209^{***}$

$^{***}p < 0,0001$  ANOVA

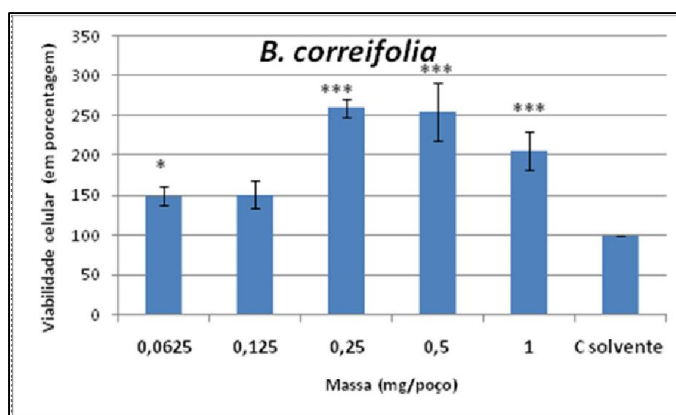
#### 4.4 Avaliação de estrogénicidade pelo E-screen

##### 4.4.1 Avaliação da citotoxicidade de 24 horas

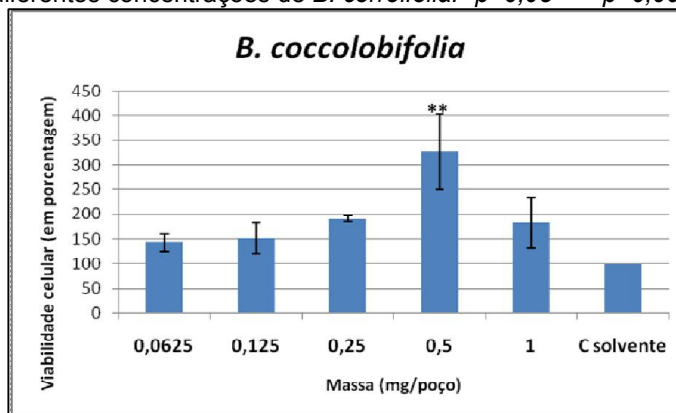
Foi observado que nenhum dos quatro extratos, em nenhuma das cinco concentrações testadas, apresentou toxicidade para as células MCF-7 BUS, após 24 horas de tratamento. As concentrações utilizadas variaram de 0,0625-1 mg/poço. Os resultados podem ser visualizados nas Figuras 5, 6, 7 e 8 para *B. verbascifolia*, *B. correifolia*, *B. coccolobifolia* e *B. ligustrifolia*, respectivamente. Em todos os experimentos os tratamentos parecem ter estimulado a viabilidade celular.



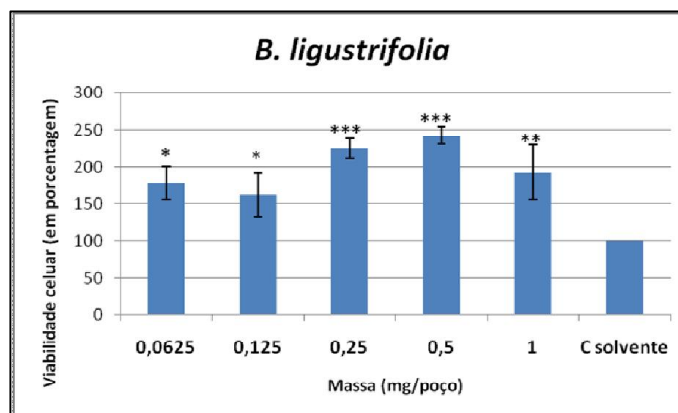
**Figura 5** Viabilidade celular em células MCF-7 BUS após 24 horas de tratamento com cinco diferentes concentrações de *B. verbascifolia*. \*  $p < 0,05$



**Figura 6** Viabilidade celular em células MCF-7 BUS após 24 horas de tratamento com cinco diferentes concentrações de *B. correifolia*. \*  $p < 0,05$  \*\*\*  $p < 0,0001$



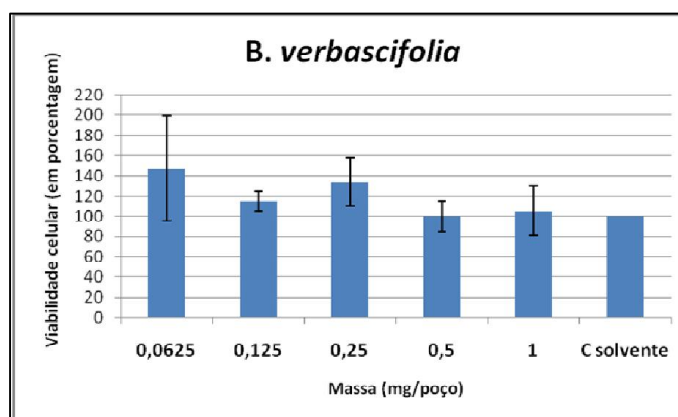
**Figura 7** Viabilidade celular em células MCF-7 BUS após 24 horas de tratamento com cinco diferentes concentrações de *B. coccolobifolia*. \*\*  $p < 0,01$



**Figura 8** Viabilidade celular em células MCF-7 BUS após 24 horas de tratamento com cinco diferentes concentrações de *B. ligustrifolia*. \*  $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,01$  \*\*\*  $p < 0,0001$

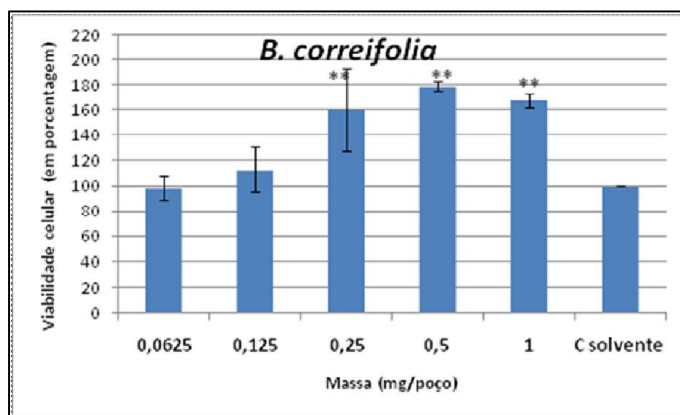
#### 4.4.2 Avaliação de citotoxicidade de 144 horas

*B. verbascifolia*, *B. correifolia* e *B. ligustrifolia* não apresentaram toxicidade, em nenhuma das cinco concentrações testadas, para as células MCF-7 BUS, após 144 horas de tratamento. Para *B. coccolobifolia*, a concentração de 0,5 mg/orifício foi levemente citotóxica, apresentando viabilidade de 76%. As massas de extrato utilizadas foram as mesmas utilizadas no ensaio de citotoxicidade de 24 horas. Os resultados podem ser visualizados nas Figuras 9, 10, 11 e 12 para *B. verbascifolia*, *B. correifolia*, *B. coccolobifolia* e *B. ligustrifolia*, respectivamente. Nesses experimentos os tratamentos também parecem ter aumentado a viabilidade celular.

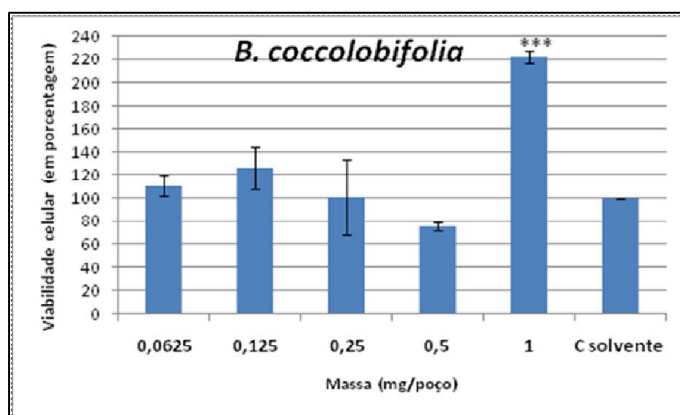


**Figura 9.** Viabilidade celular em células MCF-7 BUS após 144 horas de tratamento com cinco diferentes concentrações de *B. verbascifolia*.

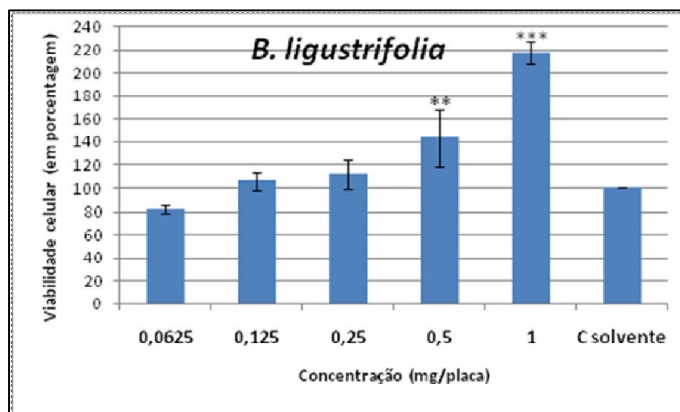




**Figura 10.** Viabilidade celular em células MCF-7 BUS após 144 horas de tratamento com cinco diferentes concentrações de *B. correifolia*. \*\*  $p < 0,01$



**Figura 11.** Viabilidade celular em células MCF-7 BUS após 144 horas de tratamento com cinco diferentes concentrações de *B. coccolobifolia*. \*\*\*  $p < 0,0001$



**Figura 12.** Viabilidade celular em células MCF-7 BUS após 144 horas de tratamento com cinco diferentes concentrações de *B. ligustrifolia*. \*\*  $p < 0,01$  \*\*\*  $p < 0,0001$

#### 4.4.3 Avaliação do E-screen

Os resultados estão apresentados na Tabela 8, e foram expressos pela média de EP de pelo menos três ensaios independentes, seus DP e pelo EPR. Os valores de EPR indicam a capacidade de proliferação celular quando comparado com o controle positivo (17- $\beta$ -estradiol). As viabilidades do ensaio E-screen estão apresentadas nas Figuras 13, 14, 15 e 16, para *B. verbascifolia*, *B. correifolia*, *B. coccolobifolia* e *B. ligustrifolia*, respectivamente,

*B. verbascifolia* e *B. correifolia* apresentaram EPR negativos para todas as concentrações indicadas, sendo classificadas então como não estrogênicas.

*B. ligustrifolia*, na concentração de 0,125 mg/poço apresentou EPR de 0,53, no entanto, o valor é muito baixo e também é considerada como não estrogênica. As demais concentrações apresentaram EPR negativo.

*B. coccolobifolia*, na concentração de 0,0625 mg/poço apresentou EPR de 24% e também foi classificada como não estrogênica, por ser abaixo de 25%. Além disso, este valor não apresentou significância estatística. Todas as outras concentrações apresentaram EPR negativo. Nas concentrações de 0,125-0,5 mg/poço, o extrato apresentou redução significativa nos seus valores de EP quando comparados com o controle de solvente, indicando possível citotoxicidade. Quando comparado com a citotoxicidade para 144 horas, a concentração de 0,5 mg/poço apresentou viabilidade menor que 80%.

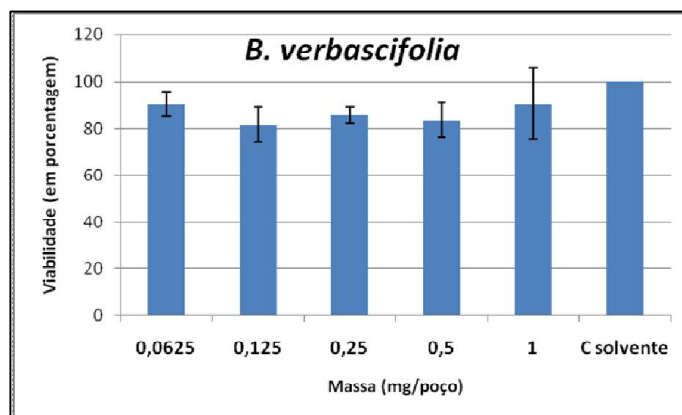
O controle positivo do ensaio apresentou EP com significância  $p < 0,0001$  quando comparado com o controle de solvente.

**Tabela 8.** Atividade estrogênica expressa pela média de EP, seu DP e EPR de *B. verbascifolia*, *B. correifolia*, *B. coccolobifolia* e *B. ligustrifolia* avaliadas pelo E-screen

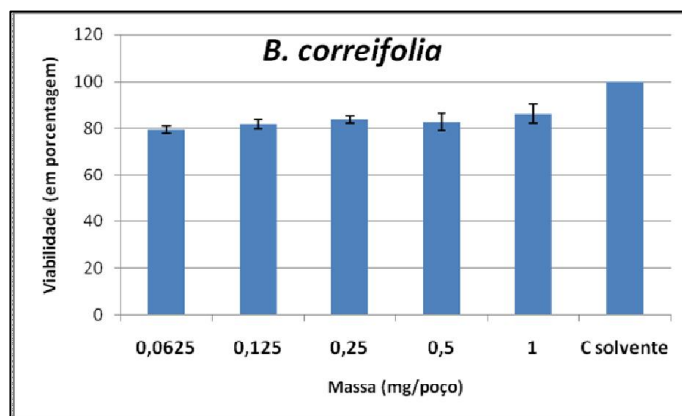
Concentração (mg/poço)	<i>B. verbascifolia</i>		<i>B. correifolia</i>	
	EP ± DP	EPR	EP ± DP	EPR
<b>C+<sup>a</sup></b>	1,55 ± 0,19***	100	1,55 ± 0,19***	100
<b>0,0625</b>	0,90 ± 0,05	-	0,80 ± 0,02	-
<b>0,125</b>	0,82 ± 0,08	-	0,82 ± 0,02	-
<b>0,25</b>	0,86 ± 0,03	-	0,84 ± 0,02	-
<b>0,5</b>	0,83 ± 0,08	-	0,83 ± 0,04	-
<b>1</b>	0,90 ± 0,15	-	0,86 ± 0,04	-
<b>C solvente<sup>b</sup></b>	1,00 ± 0,00	0	1,00 ± 0,00	0
	<i>B. ligustrifolia</i>		<i>B. coccolobifolia</i>	
	EP ± DP	EPR	EP ± DP	EPR
<b>C+<sup>a</sup></b>	1,55 ± 0,19***	100	1,55 ± 0,19***	100
<b>0,0625</b>	0,90 ± 0,10	-	1,13 ± 0,18	24,09
<b>0,125</b>	1,00 ± 0,07	0,53	0,62 ± 0,02**	-
<b>0,25</b>	0,95 ± 0,11	-	0,61 ± 0,08**	-
<b>0,5</b>	0,81 ± 0,00	-	0,54 ± 0,11**	-
<b>1</b>	0,90 ± 0,08	-	0,93 ± 0,06	-
<b>C solvente<sup>b</sup></b>	1,00 ± 0,00	0	1,00 ± 0,00	0

<sup>a</sup>Controle Positivo = 1x10<sup>-8</sup> M de 17-β-estradiol. <sup>b</sup>Controle solvente:0,2% DMSO. \*\* p<0,01,

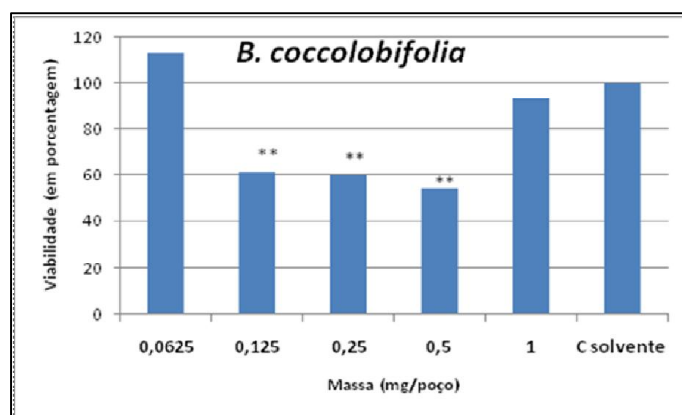
\*\*\*p<0,0001 ANOVA



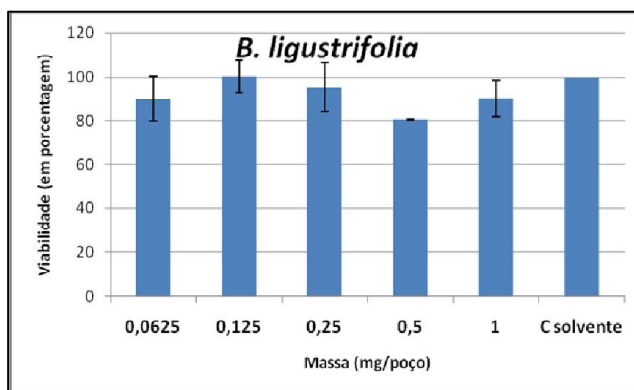
**Figura 13.** Viabilidade celular em MCF-7 BUS após o ensaio de E-screen com tratamento com cinco diferentes concentrações de *B. verbascifolia*



**Figura 14.** Viabilidade celular em MCF-7 BUS após o ensaio de E-screen com tratamento com cinco diferentes concentrações de *B. correifolia*



**Figura 15.** Viabilidade celular em MCF-7 BUS após o ensaio de E-screen com tratamento com cinco diferentes concentrações de *B. coccolobifolia*. \*\*  $p < 0,01$



**Figura 16.** Viabilidade celular em MCF-7 BUS após o ensaio de E-screen com tratamento com cinco diferentes concentrações de *B. ligustrifolia*

## 5. Discussões

### 5.1 Atividade mutagênica e antimutagênica

Em todo o mundo as plantas são amplamente utilizadas tanto como suplementos alimentares ou como medicamentos para prevenção e mitigação contra várias doenças ou enfermidades (Li et al., 2013).

O uso de plantas medicinais na medicina popular é baseado em um conhecimento empírico adquirido por séculos em diferentes grupos étnicos. A idéia de se tratar e prevenir doenças com plantas e/ ou suas partes, preparadas de diversas maneiras, é antiga. É baseada na experiência diária e foi passada de geração em geração e, hoje, constitui a base da medicina moderna (MENDANHA et al., 2010).

No Brasil, plantas do gênero *Byrsonima* (Malpighiaceae) representam uma fonte rica de derivados de catequina e epicatequina (RINALDO et al., 2010). Plantas desse gênero são usadas na medicina popular, para o tratamento de úlceras gástricas, inflamação, infecções da pele, febre e asma. Elas são popularmente conhecidas como “murici-vermelho” ou “murici-cascudo” e crescem no Cerrado. Suas espécies provaram cientificamente possuir diversas atividades farmacológicas, como antiulcerosas, antimicrobiana e mutagênica. Além destes derivados, como já mencionado anteriormente, as plantas deste gênero também são ricas em flavonóides (SANNOMIYA et al., 2004). A espécie *B. crassa* demonstrou ser mutagênica, *B. intermedia* demonstrou traços de mutagenicidade, enquanto *B. basiloba* demonstrou ser antimutagênica (CARDOSO et al., 2006; SANNOMIYA et al., 2007; LIRA et al., 2008).

Portanto, além das atividades benéficas as plantas também podem possuir atividades indesejáveis tais como a mutagênica. Nesse sentido, realizou-se o teste de Ames para avaliar a segurança do uso dessas plantas medicinais. Este teste é recomendado como um “screening” inicial uma vez que estudos demonstraram que

a proporção de carcinógenos identificados como mutágenos no teste de Ames variaram de 50 a 90% (ZEIGER, E., 2001; ABDILLAHI et al., 2012).

Segundo Cardoso et al., (2006), o extrato de *B. crassa* foi considerado mutagênico quando realizou-se o teste de Ames, devido a presença de amentoflavona. Sannomiya et al., (2007) também demonstraram que o extrato de *B. intermedia* apresenta traços de atividade mutagênica.

Em contrapartida, em estudos realizados *B. basiloba* e *B. fagifolia* não apresentaram mutagenicidade (LIRA et al.; 2008; LIMA et al.; 2008),

Tais dados são importantes, pois, as quatro plantas citadas são utilizadas na medicina popular. O uso de duas delas, *B. crassa* e *B. intermedia*, deve ser realizado com cautela. *B. crassa* atingiu RM de 2,3 enquanto *B. intermedia* de 1,7, (CARDOSO et al., 2006; SANNOMIYA et al., 2007). Isto comprova que, mesmo tendo atividade biológica, o uso de plantas medicinais só é considerado seguro após uma avaliação mais detalhada.

Em estudos recentes, Gonçalves et al., (2013), demonstraram que o extrato hidrometanólico de *B. verbascifolia* não apresentou atividade mutagênica (pelo ensaio de micronúcleo *in vivo*) em camundongos gestantes e nem apresentou atividade teratogênica.

Neste trabalho, *B. verbascifolia* e *B. correifolia* demonstraram ausência de atividade mutagênica para as cinco concentrações testadas para as quatro linhagens de *S. typhimurium*.

No entanto, *B. coccolobifolia* induziu o dobro do número de revertentes que o controle negativo na linhagem TA98, na presença e ausência de ativação metabólica. Tais resultados apontam a capacidade em causar mutações do tipo *frameshift*, mesmo após a metabolização, ou seja, indica também a presença de derivados metabólitos capazes de causar mutações. Com a cepa TA97a, houve relação dose-resposta chegando a uma razão de mutagenicidade igual 1,9, indicando indícios de mutagenicidade.

*B. ligustrifolia* também induziu o dobro de revertentes na cepa TA98, na ausência de ativação metabólica. Estes resultados indicam sua capacidade como indutor de mutações do tipo *frameshift*.

Estudos anteriores demonstraram que o extrato metanólico de *B. crassa* apresentou atividade mutagênica com o teste de Ames. A fração acetato permitiu o isolamento de quercetina-3-O- $\beta$ -D-galactopiranosídeo, quercetina-3-O- $\alpha$ -L-arabinopiranosídeo, amentoflavona, metil galato e (+)-catequina. Destes, apenas amentoflavona apresentou atividade mutagênica, concluindo que a mutagenicidade deste composto contribui para a atividade mutagênica do extrato (CARDOSO et al., 2006).

Outro estudo demonstrou que os extratos metanólicos, hidrometanólicos e clorofórmicos de *B. intermedia* foram avaliados pelo teste de Ames e a atividade mutagênica foi negativa, mas o extrato metanólico apresentou sinais de atividade mutagênica para as linhagens TA98 (+S9, -S9) e TA100 (-S9). A razão de mutagenicidade atingiu valores próximos a dois e o efeito dose resposta foi significativo. A análise fitoquímica do extrato metanólico demonstrou a presença de (+)-catequina, (-)-epicatequina, quercetina-3-O- $\beta$ -D-galactopiranosídeo, metil galato, ácido gálico, quercetina-3-O- $\alpha$ -L-arabinopiranosídeo, amentoflavona, quercetina, quercetina-3-O-(2"-O-galoil)- $\beta$ -galactopiranosídeo e quercetina-3-O-(2"-O-galoil)- $\alpha$ -arabinopiranosídeo (SANNOMIYA et al., 2007).

Comparando-se os compostos presentes no extrato metanólico de *B. intermedia* com o extrato de *B. crassa*, verificou-se um perfil semelhante, no entanto, uma variação na concentração de amentoflavona explica os resultados obtidos. Em *B. crassa*, a atividade mutagênica foi observada e o composto principal responsável era amentoflavona. Em *B. intermedia*, este biflavonóide também estava presente, mas em quantidades menores, justificando os sinais de atividade mutagênica obtidos (CARDOSO et al., 2006; SANNOMIYA et al., 2007; SANNOMIYA et al., 2004).



Quercetina ou seus derivados são flavonóides sempre presentes nos extratos de *Byrsonima* (CARDOSO et al., 2006; SANNOMIYA et al., 2007; LIRA et al., 2008) e é conhecido por seu potencial mutagênico. Resende et al. (2012) demonstraram que quercetina é altamente mutagênica nas linhagens TA98, TA100 e TA102 de *S. typhimurium* induzindo uma razão de mutagenicidade de 20,4 e este resultado sugere a contribuição de quercetina para a mutagenicidade dessas espécies.

Segundo Rodrigues, (2007), o extrato metanólico de folhas de *B. coccolobifolia* não apresenta amentoflavona, mas apresenta quercetina.

A fitoquímica de todas as espécies de *Byrsonima*, publicadas até agora, são similares e, a maior parte delas elas possuem amentoflavona e quercetina, mas em diferentes concentrações. Provavelmente para a espécie *B. ligustrifolia* esses flavonoides também contribuíram para a mutagenicidade observada. E para *B. coccolobifolia*, como amentoflavona não estava presente em seu extrato metanólico, provavelmente houve contribuição de quercetina e outros compostos ainda não identificados.

A detecção de genotoxicidade tem sido aconselhável para se evitar o risco da exposição a genotóxicos, mutágenos e carcinógenos. No entanto, alguns compostos genotóxicos não podem ser evitados, pois estão presentes na poluição do ar, ou, como alguns, podem ser encontrados em aditivos alimentícios. Além disso, alguns grupos de drogas terapêuticas também podem ser genotóxicas. Estudos de antimutagenicidade têm sido desenvolvidos para diminuir o risco da exposição a esses agentes (ARRIAGA-ALBA et al.; 2013). Há vários relatos na literatura de plantas ou sucos de frutas com alguns componentes, como os polifenóis, vitaminas, terpenos e outros compostos orgânicos desconhecidos que têm sido relatados como antimutágenos ou até mesmo como anticarcinógenos (ARRIAGA-ALBA et al., 2011).

Em um estudo, Ames et al., (1975), avaliaram a mutagenicidade de diversos produtos comerciais, entre eles, tinturas de cabelo, amplamente utilizados por mulheres de todas as idades. Concluíram que o NPD foi responsável pela maior

parte da mutagenicidade de tais corantes capilares que não requerem a ativação microssômica.

A MMC é um antibiótico (produzido por *Streptomyces*), utilizado na terapia do câncer. É um composto oxidante, que gera espécies reativas de oxigênio, causando danos ao DNA e depleção das defesas antioxidantes endógenas (MORFFI et al., 2012).

Algumas espécies de fungos, como *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* podem crescer em grãos e produzir micotoxinas em diversos produtos alimentares. As aflatoxinas, um grupo de micotoxinas, são um grupo de metabólitos secundários altamente tóxicos. São carcinogênicas, mutagênicas, teratogênicas e imunossupressoras. A AFB<sub>1</sub> é a mais potente toxina e é classificada como carcinógeno do grupo I pela International Agency for Research on Cancer. São encontradas principalmente em amendoim, milho e algodão (COLAK, et al. 2012; IARC, 2002).

Uma das principais classes de agentes cancerígenos encontrados no tabaco são os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, como o B[a]P. Esta classe é formada por produtos de combustão ubíquos e são abundantes em cigarro, exaustão de automóveis e churrasco. O B[a]P deve ser metabolizado para produzir substâncias cancerígenas, formando aductos de DNA (SEN et al., 2012; XIAO & SINGH, 2007).

Desta forma, é interessante identificar compostos que possivelmente diminuam estes efeitos.

Neste contexto, há destaque para o conceito de quimioprevenção. Como já mencionado, segundo Namasivayam (2011), a quimioprevenção pode ser definida como prevenção, inibição ou reversão da carcinogênese, por administração de uma ou mais entidades químicas, sendo elas drogas individuais ou como constituintes de ocorrência natural da dieta. Um dos mecanismos da quimioprevenção é a antimutagênese.

Lira et al., (2008), demonstraram que o extrato de *B. basiloba* possui atividade antimutagênica contra NPD, AFB<sub>1</sub>, B[a]P, AZS, MCC e peróxido de hidrogênio.

*B. verbascifolia* e *B. correifolia* avaliadas no presente estudo não apresentaram atividade mutagênica para nenhuma das quatro linhagens e, desta forma, realizou-se os estudos de antimutagenicidade com estes extratos.

Neste trabalho, *B. verbascifolia* e *B. correifolia* se apresentaram como forte antimutagênicos frente ao NPD, pois, atingiram porcentual de inibição de 48% e 51%, respectivamente. As amostras foram capazes de prevenir mutações do tipo *frameshift*.

Associadas à MMC, *B. verbascifolia* e *B. correifolia*, não apresentaram atividade antimutagênica. No entanto, *B. correifolia* reduziu significativamente o número de revertentes em três das cinco concentrações utilizadas.

Em relação à AFB<sub>1</sub>, pode-se dizer que *B. verbascifolia* e *B. correifolia* se apresentaram como forte antimutagênicos, chegando aos percentuais de inibição do número de revertentes de 91% e 80%, respectivamente. Isso demonstra o potencial das amostras em ser utilizado como protetor frente a mutágenos indiretos, ou seja, que precisam de metabolização. Além disso, *B. verbascifolia* apresentou porcentual de inibição de 90% em quatro das cinco concentrações utilizadas, ou seja, mesmo aumentando a concentração do extrato, o porcentual de inibição continuou o mesmo.

O mesmo pode-se dizer em relação ao B[a]P, visto que, *B. verbascifolia* apresentou 82% de inibição e *B. correifolia* 83%, podendo prevenir mutações do tipo *frameshift* e também sendo considerados como forte antimutagênicos. Além disso, pode-se observar que as cinco concentrações avaliadas de *B. correifolia* também não variaram quanto à dose-resposta, mantendo-se o porcentual de inibição entre 79-83%. Este dado reforça a eficácia deste extrato como bom protetor.

Pode-se observar que os extratos foram sempre considerados como forte antimutagênicos, com exceção quando associados a MMC. No entanto, os

porcentuais de inibição frente aos mutágenos que necessitavam de ativação metabólica foram muito maiores do que os que não necessitavam. Estes dados sugerem que estas espécies de *Byrsonima* possuem um efeito antimutagênico melhor quando metabolizadas, ou seja, provavelmente após a metabolização há algum derivado metabólico que otimiza seu potencial antimutagênico. Frente ao NPD, que foi testado na linhagem TA98(-S9), *B. verbascifolia* e *B. correifolia* atingiram porcentuais de inibição de até 51%, mas, quando comparados com a associação com B[a]P, testado na mesma linhagem, mas na presença de S9, obteve-se porcentuais de inibição de até 83%.

Mendanha et al., (2010), em estudos com extratos aquosos de *B. verbascifolia* verificaram ação moduladora significativa contra danos induzidos por doxorrubicina (conhecida por causar morte celular devido a danos no DNA) em células somáticas de *Drosophila melanogaster*.

Estudos anteriores mostraram que não se observou atividade mutagênica para os extratos metanólicos e clorofórmicos de *B. basiloba*, no entanto, ambos extratos demonstraram atividade antimutagênica. O maior porcentual de inibição atingido foi 89% com o extrato metanólico e a linhagem TA100, quando associado à AFB<sub>1</sub>. A análise fitoquímica do extrato revelou a presença de n-alcanos, lupeol, ácido ursólico e oleanólico, (+)-catequina, quercetina-3-O- $\alpha$ -L-arabinopiranosídeo, ácido gálico, metil galato, amentoflavona, quercetina, quercetina-3-O-(2"-O-galoil)- $\beta$ -D-galactopiranosídeo, e quercetina-3-O-(2"-O-galoil)- $\alpha$ -L-arabinopiranosídeo (LIRA et al., 2008).

Embora o biflavonóide amentoflavona tenha apresentado atividade mutagênica, a quantidade deste composto presente no extrato metanólico de *B. basiloba* (1,79 mg/g extrato) é muito menor do que a encontrada nos extratos de *B. crassa* (17,04 mg/g de extrato) e *B. intermedia* (13,70 mg/g de extrato (LIRA et al., 2008; SANNOMIYA et al., 2007).

Em seu estudo, Rinaldo et al. (2010) demonstraram que os extratos metanólicos e infusões de folhas de cinco espécies de *Byrsonima* foram analisadas.

Somente em *B. coccolobifolia* não foi possível observar a presença de catequinas e epicatequinas. Não obstante, nas outras quatro espécies analisadas, foi possível observar que os extratos metanólicos apresentaram quantidades maiores de catequinas que as infusões por grama de folhas. *B. basiloba* demonstrou altas concentrações de diasterômeros de catequinas seguida por *B. verbascifolia*, *B. crassa*, e *B. intermedia*.

Os resultados deste trabalho estão de acordo com os mencionados previamente. *B. verbascifolia* não demonstrou atividade mutagênica, assim como *B. basiloba* (Lira et al., 2008) e ambas são antimutagênicas. Todas elas demonstraram altas concentrações de catequinas (RINALDO et al., 2010), sugerindo que as catequinas contribuem para a atividade antimutagênica. Este fato está de acordo com estudos que afirmam que catequinas são conhecidas por suas propriedades antimutagênicas e câncer preventivo (BAUMEISTER, et al., 2012; XU et al., 2010). De acordo com LIMA NETO (informação pessoal) *B. correifolia* também possui catequinas em sua constituição.

Não se pode deixar de enfatizar a excelente ação protetora de *B. verbascifolia* e *B. correifolia*, especialmente com compostos que requerem a ativação metabólica. Estes extratos foram considerados como forte antimutagênicos contra três das quatro associações com mutágenos avaliadas.

Conforme o conceito de quimioprevenção, aqui já mencionado, por Namasivayam, (2011), a quimioprevenção pode ser definida como prevenção da carcinogênese, e um dos mecanismos envolvidos neste processo é a antimutagênese. Assim, pode-se dizer que *B. verbascifolia* e *B. correifolia* foram excelentes agentes quimiopreventivos.

Portanto, é importante a continuação dos estudos de análise fitoquímica com os extratos etanólicos para assegurar o conteúdo químico das espécies.

O estudo com plantas medicinais deve ser encorajado devido a várias propriedades benéficas confirmadas e novas descobertas, e principalmente, para

garantir a segurança de seu uso, pois, como demonstrado, algumas espécies podem causar riscos aos usuários.

## **5.2 Atividade estrogênica**

Como já mencionado, desreguladores endócrinos são compostos químicos que podem colocar em risco o equilíbrio de hormônios esteróides no organismo (FRYE et al., 2012). Os que mimetizam o estradiol são especialmente relevantes, tanto em termos ambientais como de saúde pública (GARCIA-REYERO et al., 2007).

Neste sentido, existem duas vertentes que justificam o interesse do estudo de atividade estrogênica. Primeiramente, a possibilidade do uso como fitoestrógenos, que podem ser definidos como compostos naturais não esteroidais, geralmente constituintes de plantas ou seus metabólitos, que induzem respostas biológicas em mamíferos, mimetizando ou modulando a ação de estrógenos endógenos (MICHEL et al., 2013). Outra vertente que justifica o estudo é o risco que compostos estrogênicos apresentam como contaminantes ambientais.

Ettebong et al., (2011), avaliaram a atividade estrogênica e contraceptiva de extratos etanólicos da planta medicinal *Carpolobia lutea* em roedores. Em baixas doses, o extrato apresentou atividade estrogênica, enquanto em altas doses, apresentou atividade antiestrogênica. Além disso, o extrato apresentou atividade contraceptiva. Tais dados comprovam a importante atuação de plantas medicinais como compostos estrogênicos.

De acordo com Afeiche et al., (2013), produtos lácteos contêm quantidades mensuráveis de estrógenos, contribuindo para 60-80% da ingestão de estrógenos de origem alimentar. A ingestão destes produtos, em garotos, causou aumento dos níveis circulantes de hormônio do crescimento e aumentou a excreção de estrona, estriol, estradiol (E2) e pregnanediol. Em homens, a ingestão de laticínios está relacionada com a diminuição da secreção de LH, FSH e testosterona.

Boldrin et al., (2013) em seus estudos, demonstraram que o extrato etanólico de *Crotalaria pallida*, avaliados pelo ensaio RYA, é estrogênico e possui EEQ de 14,3 nM, enquanto o stigmasterol, uma substância isolada possui EEQ de 122 nM.

Camargo et al., (2013), demonstraram que o nemorosone, composto majoritário encontrado no própolis Cubano, extraído de *Clusia rosea*, não apresentou atividade estrogênica quando avaliado pelos ensaios RYA e E-screen.

Resende et al., (2013), avaliaram a estrogenicidade de diversos flavonóides pelos Ensaios RYA e E-screen. O kaempferol foi o único composto que demonstrou atividade estrogênica pelo ensaio RYA, com EEQ de 6,74 nM. Além disso, foi considerado um agonista pleno no ensaio proliferativo de células MCF-7 BUS. Os compostos galangina, luotelina e fisetina embora não tenham sido considerados estrogênicos pelo ensaio RYA, foram considerados como agonistas parciais no ensaio de proliferação celular E-screen.

Oliveira et al., (2013) avaliaram a estrogenicidade de plantas do gênero *Syngonanthus*. Neste estudo, apenas o extrato metanólico da espécie *S. nitens* possui potencial estrogênico, com EEQ de 14,74 nM.

Quando avaliadas pelo teste RYA, *B. verbascifolia* e *B. coccolobifolia* não foram consideradas estrogênicas. *B. correifolia* apresentou um EEQ no valor de 0,13 nM e *B. ligustrifolia* no valor de 0,55 nM, evidenciando seus baixos potenciais estrogênicos, quando comparados a outras plantas consideradas estrogênicas. A análise estatística de seus resultados, comparando-se as leituras no primeiro e no vigésimo minuto, mostrou diferenças não significativas. Isso demonstra que não houve aumento significativo da primeira para a última leitura, como ocorreu com o controle positivo.

Em relação a citotoxicidade de 24 horas em células MCF-7 BUS, pode-se observar que a viabilidade celular foi maior que 100% em todas os extratos testados, e em todas as concentrações. Atingiram-se viabilidades maiores que 200% em todas as espécies e, em *B. coccolobifolia* atingiu-se viabilidade maior que 300%,

indicando um possível efeito proliferativo dos extratos. Este ensaio foi realizado na ausência de SBF e em meio DMEM com vermelho de fenol.

Durante o ensaio de citotoxicidade de 144 horas, observou-se que *B. verbascifolia* e *B. correifolia* também não foram citotóxicas e todas as viabilidades de para todas as concentrações testadas estavam próximas ou superiores a 100%. *B. ligustrifolia*, embora não tenha sido considerada citotóxica, em uma das concentrações chegou a apresentar viabilidade de 82%. *B. coccolobifolia* foi considerada citotóxica, em sua concentração de 0,5 mg/poço, mas nas outras concentrações avaliadas não houve citotoxicidade. *B. coccolobifolia* e *B. ligustrifolia* apresentaram viabilidades superiores a 200%. Novamente, indicando um possível efeito proliferativo. Este ensaio ocorreu em meio DMEM com vermelho de fenol e suplementado com 10% de SFB (devido ao longo período de incubação).

Comparando-se os resultados das citotoxicidades de 24 e 144 horas pode-se observar, no geral, uma discreta diminuição nas viabilidades máximas obtidas para todas as amostras. Este fato pode ser explicado devido ao longo período de incubação, de seis dias, sem trocar o meio das células. Além disso, Berthois et al., (1986), observou que a proliferação celular, em meio com vermelho de fenol, é reduzida em altas concentrações de soro.

Em relação ao ensaio de proliferação celular com células de câncer de mama MCF-7 BUS, o ensaio E-screen, todas as amostras foram consideradas como não estrogênicas. *B. verbascifolia* e *B. correifolia* apresentaram EPR negativo para todas as concentrações testadas. Embora *B. ligustrifolia* e *B. coccolobifolia* apresentem um EPR positivo, seus valores são baixos e, conforme descrito por Kuch et al., (2010), também são consideradas como não estrogênicas. Além disso, o EPR obtido por estes dois extratos não foi considerado significativo durante a análise estatística.

Pode-se observar também, na amostra de *B. coccolobifolia* que nas concentrações do intervalo 0,125-0,5 mg/poço houve redução do crescimento celular significativa, o que indica a possibilidade de citotoxicidade. No ensaio de citotoxicidade de 144 horas, observa-se que a concentração de 0,5 mg/poço



apresentou viabilidade de 75%, sendo considerada como citotóxica, confirmando o resultado obtido no E-screen. Embora as concentrações de 0,125 mg/poço e 0,25 mg/poço também tenham apresentado uma redução significativa no ensaio E-screen, durante o ensaio de citotoxicidade este fato não foi observado.

Durante o ensaio de E-screen, que foi realizado sem vermelho de fenol e com soro livre de hormônios, no entanto, não se observou efeito proliferativo. Uma comparação entre os resultados de citotoxicidade e E-screen pode ser visualizada na Tabela 9, conforme as condições de realização de cada ensaio. Os resultados compilados na tabela 9 sugerem que as altas viabilidades obtidas durante os ensaios de citotoxicidade provavelmente ocorreram devido a interação dos extratos com o vermelho de fenol visto que, no ensaio do e-screen onde o vermelho de fenol não estava presente e o soro livre de hormônios, não foi verificada proliferação celular. Além disso, nos ensaios de citotoxicidade em 24 horas (onde só havia o vermelho de fenol) foram obtidas viabilidades celulares semelhantes aos ensaios de citotoxicidade em 144 horas (realizados em presença de soro com hormônios e vermelho de fenol).

**Tabela 9.** Comparação dos resultados de citotoxicidade e E-screen

Ensaio	Condição realizada			Possível Efeito Proliferativo
	VF*	SBF	Amostra	
Citotoxicidade 24 horas	+	-	+	Sim
Citotoxicidade de 144 horas	+	+	+	Sim
E-screen	-	+(livre de hormônios)	+	Não

\*VF= Vermelho de fenol

Este resultado está de acordo com Berthois et al., (1986) que provaram que o vermelho de fenol possui atividade estrogênica significativa nas concentrações de 15-45  $\mu\text{M}$  (concentrações encontradas nos meios de cultura). Ainda, segundo o grupo, o vermelho de fenol se liga aos receptores de estrógenos das células MCF-7 com uma afinidade de 0,001% da do estradiol. Nas concentrações presentes no meio de cultura, o vermelho de fenol causa estimulação estrogênica parcial aumentando o número de células para 200%. Embora a afinidade pelo receptor seja baixa, o vermelho de fenol está presente em altas concentrações nos meios, chegando a 45  $\mu\text{M}$  nos meio DMEM.

Ainda neste mesmo estudo, Berthois et al., (1986), observaram que o soro altera a taxa de proliferação celular de MCF-7. Em meio completo, que continha 30  $\mu\text{M}$  de vermelho de fenol, a proliferação celular foi maior em baixas concentrações de soro e foi substancialmente reduzida em altas concentrações de soro (20%). Quando se utilizou meio livre de vermelho fenol, a proliferação celular foi significativamente diminuída em todas as concentrações de soro. Além disso, o vermelho de fenol estimulou a proliferação celular de forma dose-dependente.

Nota-se que o vermelho de fenol possui certa semelhança estrutural a alguns estrógenos, e os grupos hidroxilas fenólicos estão em posições importantes para a relação estrutura atividade de moléculas estrogênicas (WELSHONS, et al., 1988), conforme se visualiza na Figura 17.

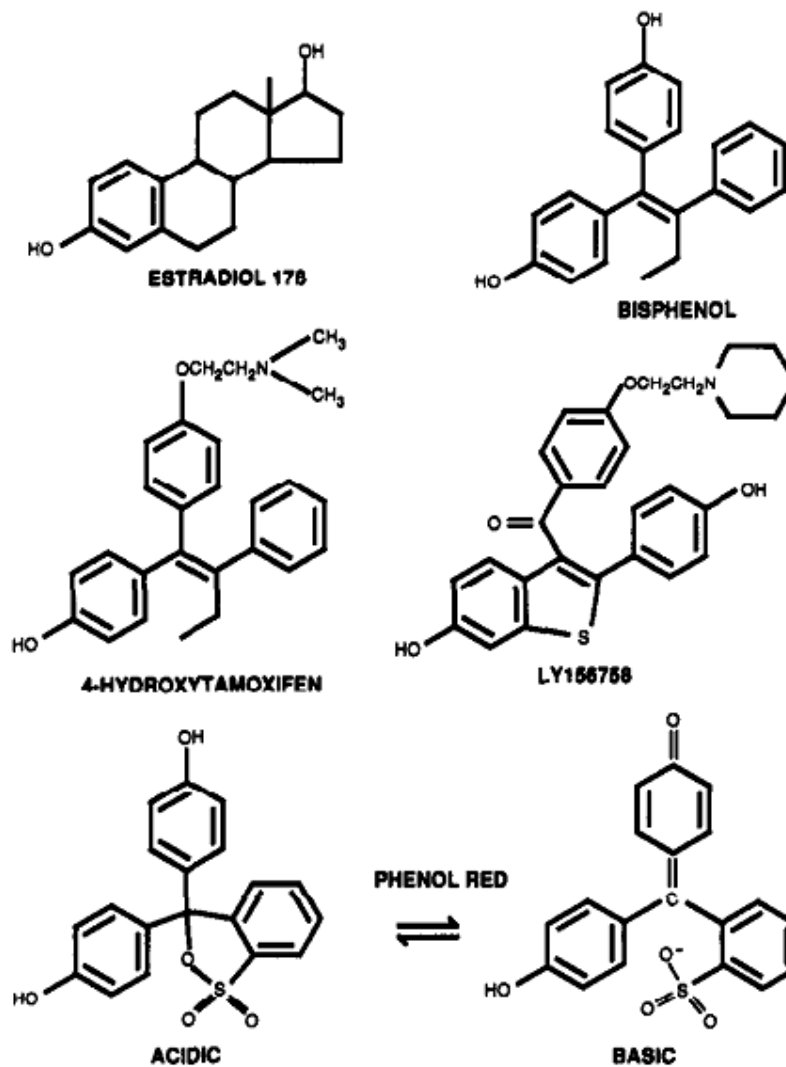


Figura 17. Estrutura de compostos estrogênicos (WELSHONS, et al., 1988)

Em seu estudo, Welshons et al., (1988), avaliaram diversas amostras comerciais de vermelho de fenol e observaram que a atividade estrogênica variava de acordo com os fornecedores. Propuseram que a atividade estrogênica predominante do vermelho de fenol pode ser de um contaminante, fracamente solúvel em água, em vez do vermelho de fenol propriamente dito. A identidade deste material ainda era desconhecida.

Rajendran et al., (1987), com os resultados de seus experimentos, discordam de Berthois et al., (1986) na hipótese de que o vermelho de fenol poderia interagir com o sítio de ligação do estradiol no receptor estrogênico. Esta equipe observou que o

vermelho de fenol causou ativação do receptor e translocação nuclear. Segundo eles, o mecanismo pelo qual o vermelho de fenol ativa o receptor ainda não é compreendido, mas como seus experimentos não demonstraram inibição competitiva da ligação do estrógeno, propuseram que o vermelho de fenol possui efeito estrogênico através da ativação de receptor citoplasmático por interação com um sítio distinto do sítio de ligação do estrógeno.

Desta forma, deve-se ressaltar que embora haja uma pequena resposta estrogênica para *B. correifolia* e *B. ligustrifolia* no ensaio RYA e para *B. coccolobifolia* e *B. ligustrifolia* no ensaio E-screen, este potencial não foi significativo.

## 6. Conclusões

### 6.1 Atividade mutagênica

- *B. verbascifolia* e *B. correifolia* não foram capazes de induzir aumento no número de revertentes em nenhuma das quatro linhagens de *S. typhimurium*, não sendo, então, consideradas mutagênicas para esse sistema.

-*B. coccolobifolia* apresentou atividade mutagênica frente à linhagem TA98 (na presença e ausência de ativação metabólica) e indícios de mutagenicidade frente a linhagem TA97a na presença de ativação metabólica podendo ser considerada como mutágeno direto e indireto pelo mecanismo de *frameshift*.

-*B. ligustrifolia* apresentou atividade mutagênica frente à linhagem TA98, na ausência de S9 podendo ser considerado como mutágeno direto pelo mecanismo de *frameshift*.

-De acordo com os perfis fitoquímicos de espécies do mesmo gênero e também pelos resultados da atividade mutagênica, sugere-se a contribuição da amentoflavona e quercetina provavelmente em maior quantidade nos extratos mutagênicos, e em menor quantidade nos não mutagênicos.

-É importante o estudo de avaliação da atividade mutagênica pois pode-se garantir o uso seguro de plantas. Embora haja muitos estudos sobre atividades biológicas, ainda há poucos trabalhos garantindo a segurança.

### 6.2 Atividade antimutagênica

-*B. verbascifolia* e *B. correifolia* podem ser consideradas antimutagênicas fortes frente aos compostos NPD, AFB<sub>1</sub> e B[a]P.

-*B. verbascifolia* e *B. correifolia* não são consideradas como antimutagênicas quando associadas a MMC.

-*B. verbascifolia* e *B. correifolia* apresentaram maiores percentuais de inibição quando submetidas a sistema de metabolização.

-De acordo com os perfis fitoquímicos as catequinas possivelmente contribuíram para a antimutagenicidade observada.

### **6.3 Atividade estrogênica**

- No teste RYA os extratos de *B. verbascifolia* e *B. coccolobifolia* não foram estrogênicos e os extratos de *B. correifolia* e *B. ligustrifolia*, apresentaram um fraco potencial estrogênico, demonstrando uma baixa interação com o receptor de estrógenos.

- No ensaio E-screen, *B. verbascifolia*, *B. correifolia*, *B. coccolobifolia* e *B. ligustrifolia* não induziram proliferação celular das células MCF-7 BUS o que indica ausência de estrogenicidade.

-Os ensaios de citotoxicidade de 24 e 144 horas bem como os ensaios de proliferação para as células MCF-7 BUS, deixam claro a influencia da interação do vermelho de fenol e amostras nos resultados obtidos.

## 7. Referências

- ABDILLAHI, H. S.; VERSCHAEVE, L.; FINNIE, J. F.; VAN STADEN, J. Mutagenicity, antimutagenicity and cytotoxicity evaluation of South African *Podocarpus* species. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 139, p.728-738, 2012.
- AFEICHE, M. WILLIAMS, P. L.; MENDIOLA, J.; GASKINS, A. J.; JORGENSEN, N.; SWAN, S. H.; CHAVARRO, J. E. Dairy food intake in relation to semen quality and reproductive hormone levels among physically active young men. **Human reproduction**, v. 0, p.1-11, 2013.
- AGRA, M. F.; SILVA, K. N.; BASÍLIO, I. J. L. D.; DE FREITAS, P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.18, p. 472–508, 2008.
- ALBERTAZZI, P.; PURDIE, D. W. Reprint of The nature and utility of the phytoestrogens: a review of the evidence. **Maturitas**, v. 61, p. 214 -229, 2008.
- ALMEIDA, S. P. et al. **Cerrado: espécies vegetais úteis**. Planaltina: EMBRAPA, p. 38-39 ,1998.
- AMES, B. N.; KAMMEN, H. O.; YAMASAKI, E. Hair Dyes are mutagenic: Identification of a variety of mutagenic ingredients. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.72, p.2423-2427, 1975.
- ARRIAGA-ALBA, M.; BLASCO, J L.; RUÍZ-PÉREZ, N. J.; SÁNCHEZ-NAVARRETE, J.; RIVERA-SÁNCHEZ, R.; GONZÁLEZ-AVILA, M. Antimutagenicity mechanisms of the *Rhoeo discolor* ethanolic extract. **Experimental and Toxicology Pathology**, v. 63, p.243-248, 2011.
- ARRIAGA-ALBA, M.; RUIZ-PÉREZ, N. J.; SÁNCHEZ-NAVARRETE, J.; DE ANGEL, B. L.; FLORES-LOZADA, J.; BLASCO, J. L. Antimutagenic evaluation of vitamins B1, B6 and B12 in vitro and in vivo, with the Ames test. **Food and Chemical Toxicology**, v. 53, p.228-234, 2013.
- BARROSO, G. M.; PEIXOTO, A. L.; ICHASO, C. L. F.; COSTA, C. G.; GUIMARÃES, E. F.; LIMA, H. C. *Sistemática de Angiospermas do Brasil*. v.2. Imprensa Universitária da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1984.

- BAUMEISTER, P.; REITER, M.; HARRÉUS, U. Curcumin and Other Polyphenolic Compounds in Head and Neck Cancer Chemoprevention. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1155/2012/902716>. Acesso em: 18 nov. 2013. In Press
- BERGER, I.; BARRIENTOS, A. C.; CACERES, A.; HERNANDEZ, M.; RASTRELLI, L.; PASSREITER, C. M.; KUBELKA, W. Plants used in Guatemala for the treatment of protozoal infections II. Activity of extracts and fractions of five Guatemalan plants against *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 62, p. 107-115, 1998.
- BERNSTEIN, L.; KALDOR, J.; MCCANN, J.; PIKE, M. C. An empirical approach to the statistical analysis of mutagenesis data from the Salmonella test. **Mutation Research**, v.97, p.267–281, 1982.
- BERTHOIS, Y.; KATZENELLENBOGEN, J. A.; KATZENELLENBOGEN, B. Phenol red in tissue culture media is a weak estrogen: Implication concerning the study of estrogen-responsive cells in culture. **Proc. Natl. Acad. Sci USA**, v. 83, p.2496-2500, 1986.
- BOLDRIN, P. L.; RESENDE, F. A. ; HOHNE, A. P. O, CAMARGO, M. S.; ESPANHA, L. G.; NOGUEIRA, C. H, MELO, M. S . F.; VILEGAS, W.; VARANDA, E. A. Estrogenic and mutagenic activities of *Crotalaria pallida* measured by recombinant yeast assay and Ames test. **BMC Complementary & Alternative medicine**, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1186/1472-6882-13-216> . Acesso em: 18 nov. 2013. InPress
- BONACORSI, C.; RADDI, M. S. G.; DA FONSECA, L. M.; SANNOMIYA, M.; VILEGAS, W. Effect of *Byrsonima crassa* and Phenolic Constituents on *Helicobacter pylori*-Induced Neutrophils Oxidative Burst. **International Journal of Molecular Sciences**, v.13, p.133-141, 2012.
- BOUHLEL, I.; MANSOUR, H. B.; LIMEM, I.; SGHAIER, M. B.; MAHMOUD, A.; CHIBANI, J.B; GHEDIRA, K.; CHEKIR-GHEDIRA, L. Screening of antimutagenicity via antioxidant activity in different extracts from the leaves of *Acacia salicina* from the center of Tunisia. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 23, p. 56-63, 2007.
- CACERES, A.; FIGUEROA, L.; TARACENA, A. M.; SAMAYOA, B. Plants used in Guatemala for the treatment of respiratory diseases. 2: Evaluation of activity of 16 plants against Gram-positive bacteria. **Jornal of Ethnopharmacology**, v. 39, p. 77-82, 1993.



- CAMARGO, M. S.; PRIETO, A. M.; RESENDE, F. A.; BOLDRIN, P. K.; CARDOSO, R. P. C.; FERNÁNDEZ, M. F.; MOLINA-MOLINA, J. M.; OLEA, N.; VILEGAS, W.; CUESTRA-RUBIO, O.; VARANDA, E. A. Evaluation of estrogenic, antiestrogenic and genotoxic activity of nemorosone, the major compound found in Brown Cuban própolis. **BMC Complementary & Alternative Medicine**, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1186/1472-6882-12-201> . Acesso em 18 nov.2013.
- CARDOSO, C. R. P.; CÓLUS, I. M. S.; BERNARDI, C. C.; SANNOMIYA, M.; VILEGAS, W.; VARANDA, E. A. Mutagenic activity promoted by amentoflavone and methanolic extract of *Byrsonima crassa* Niedenzu. **Toxicology**, v. 225, p.55- 63, 2006.
- CECILIO, A.B.; DE FARIA, D. B.; OLIVEIRA, P. C.; CALDAS, S.; DE OLIVEIRA, D. A.; SOBRAL, M. E. G.; DUARTE, M. G. R.; MOREIRA, C. P. S.; SILVA, C. G.; DE ALMEIDA, V. L. Screening of Brazilian medicinal plants for antiviral activity against rotavirus. **Journal of Ethnopharmacology**, v.141, p. 975-981, 2012.
- CÉSPEDES, R.; LACORTE, S.; RALDUÁ, D.; GINEBREDÀ, A.; BARCELÓ, D.; PIÑA, B. Distribution of endocrine disruptors in the Llobregat River basin (Catalonia, NE Spain). **Chemosphere**, v. 61, p.1710-1719, 2005.
- CHEN, T.-I.; ZHUANG, H.-W.; CHIAO, Y.-C.; CHEN, C.-C.; Mutagenicity and genotoxicity effects of *Lignosus rhinocerotis* mushroom mycelium. **Journal of ethnopharmacology**, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2013.06.001>. Acesso em: 3 jul. 2013. In Press
- CLENILSON, M. R. Caracterização quali e quantitativa de metabólitos secundários em extratos vegetais. Araraquara, SP: 2007. 199p.
- COLAK, H.; HAMPIKYAN, H.; BINGOL, E. B.; CETIN, O.; AKHAN, M.; TURGAY, S. I. Determination of Mould and Aflatoxin Contamination in Tarhana, a Turkish Fermented Food. **The scientific World Journal**, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1100/2012/218679> . Acesso em: 1 dez. 2013.Epub.
- DAUER, A.; HENSEL, A.; LHOSTE, E.; KNASMULLER, S.; MERSCH-SUNDERMANN, V. Genotoxic and antigenotoxic effects of catechin and tannins from the bark of *Hamamelis virginiana* L. in metabolically competent, human hepatoma cells (Hep G2) using single cell gel electrophoresis. **Phytochemistry**, v.63, p.199-207, 2003.

- DE FLORA, S. Mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. **Mutation Research**, v.402, p.151-158, 1998.
- DE PASQUALE, A. Pharmacognosy: The oldest modern science. **Journal of Ethnopharmacology**, v.11, p.1-16, 1984.
- DEWELL, A.; HOLLENBECK, C. B.; BRUCE, B. The effects of soy-derived phytoestrogens on serum lipids and lipoproteins in moderately hypercholesterolemic postmenopausal women. **Journal of Clinical Endocrinology Metabolism.**, v. 87, p. 118 -121, 2002.
- ESTEVES-PEDRO, N. M.; BORIM, T.; NAZATO, V. S.; SILVA, M. G.; LOPES, P. S.; DOS SANTOS, M. G.; DAL BELO, C. A.; CARDOSO, C. R. P.; VARANDA, E. A.; GROppo, F. C.; GERENUTTI, M.; OSHIMA-FRANCO, Y. *In vitro* and *in vivo* safety evaluation of *Dipteryx alata* Vogel extract. BMC Complementary and Alternative Medicine, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1186/1472-6882-12-9> .Acesso em: 27 jan. 2014.
- ETTEBONG, E. O.; NWAFOR, P. A.; EKPO, M.; AJIBESIN, K. K. Contraceptive, estrogenic and anti-estrogenic potentials of methanolic root extract of *Carpolobia lutea* in rodents. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 24, p.445-449, 2011.
- FIGUEIREDO, M. E.; MICHELIN, D. C.; SANNOMIYA, M.; SILVA, M. A.; DOS SANTOS, L. C.; ALMEIDA, L. F. R.; SOUZA BRITO, A. R. M.; SALGADO, H. R. N.; VILEGAS, W. Avaliação química e da atividade anti-diarréica das folhas de *Byrsonima cinera* DC. (Malpighiaceae). **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, p.79-83, 2005.
- FRYE, C.; BO, E.; CALAMANDREI, G.; CALZA, L.; DESSI-FULGHERI, F.; FERNÁNDEZ, M.; FUSANI, L.; KAH, O.;KAJTA, M.; LE PAGE, Y.; PATISAUL, H. B.; VENEROSI, A.; WOJTOWICZ, A. K.; PANZICA, G. C. Endocrine Disrupters: A review of some sources, effects, and mechanisms of actions on behaviours and neuroendocrine systems. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 24, p.144-159, 2012.
- GARCIA-REYERO, N.; GRAU, E.; CASTILLO, M.; ALDA, M. J. L.; BARCELÓ, D. PIÑA, B.. Monitoring of endocrine disruptors in surface waters by the yeast recombinant assay. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 20, p. 1152-1158, 2001.
- GARCIA-REYERO, N.; GRIMALT, J. O.; VIVES, I.; FERNANDEZ, P.; PIÑA, B. Estrogenic activity associated with organochlorine compounds in fish

extracts from European mountain lakes. **Environmental Pollution**, v. 145, p. 745-752, 2007.

- GONÇALVES, C. A.; SIQUEIRA, J. M.; CAROLLO, C. A.; MAURO, M. O.; DE DAVI, N.; CUNHA-LAURA, A. L.; MONREAL, A. C. D.; CASTRO, A. H.; FERNANDES, L.; CHAGAS, R. R.; AUHAREK, S. A.; OLIVEIRA, R. J. Gestacional exposure to *Byrsonima verbascifolia*: teratogenicity, mutagenicity and immunomodulation evaluation in female Swiss mice. **Journal of Ethnopharmacology**, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2013.09.012>. Acesso em: 16 nov. 2013. In Press.
- GUEVARA, A. P.; AMOR, E.; RUSSEL, G. Antimutagens from *Plumeria acuminata* Ait. **Mutation research**, v.361, p.67-72, 1996.
- GUILHON-SIMPLICIO, F.; PEREIRA, M. M. Aspectos químicos e farmacológicos de *Byrsonima* (MALPIGHIACEAE). **Química Nova**, v. 34, p-1032-1041, 2011.
- GUILHON-SIMPLICIO, F.; PINHEIRO, C. C. S.; CONRADO, G. G.; BARBOSA, G. S.; DOS SANTOS, P. A.; PEREIRA, M. M. Anti-inflammatory, anti-hyperalgesic, antiplatelet and antiulcer activities of *Byrsonima japurensis* A. Juss. (Malpighiaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v.140, p.282-286, 2012.
- GUO, H.; WANG, D. S.; RIZWANI, G. H.; AHMED, M.; HASSAN, A.; XU, R. H.; MANSOOR, N.; TIWARI, A. K.; CHEN, Z. S. Antineoplastic activity of *Holoptelea integrifolia* (Roxb.) Planch bark extracts (in vitro). **Pak J Pharm Sci**, v. 26, p. 1151-1156, 2013.
- IARC (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. Some Traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene. **IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans**, v. 82, p.169-249, IARC Press, Lyon, France, 2002.
- KIRSCH-VOLDERS, M.; VANHAUWAERT, A.; EICHENLAUB-RITTER, U.; DECORDER, I. Indirect mechanisms of genotoxicity. **Toxicology Letters**, v.140-141, p. 63-74, 2003.
- KUCH, B.; KERN, F.; METZGER, J. W.; THEO, K.; VON DER TRENCK, K. T. Effect-related monitoring: estrogen-like substances in groundwater. **Environ Sci Pollut Res**, v. 17, p.250-260, 2010.
- KUMAR, S.; GAUTAM, S.; SHARMA, A. Antimutagenic and antioxidant properties of plumbagin and other naphthoquinones. **Mutation Research:**

**Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrgentox.2013.05.007>. Acesso em: 3 jul. 2013. In Press.

- KURZER, M. S.; XU, X. Dietary phytoestrogens. **Annual Review of Nutrition**, v. 17, p. 353-381, 1997.
- LI, S.; QIU, S.; YAO, P.; SUN, H.; FONG, H. H. S.; ZHANG, H. Compounds from the Fruits of the Popular European Medicinal Plant *Vitex agnus-castus* in Chemoprevention via NADP (H): Quinone Oxireductase Type 1 Induction. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1155/2013/432829> . Acesso em: 1 dez. 2013. Epub.
- LIMA, Z. P.; SANTOS, R. C.; TORRES, T. U.; SANNOMIYA, M.; RODRIGUES, C. M.; SANTOS, L. C.; PELLIZZON, C. H.; ROCHA, L. R. M.; VILEGAS, W.; BRITO, A. R. M. S.; CARDOSO, C. R. P.; VARANDA, E. A.; MORAES, H. P.; BAUAB, T. M.; CARLI, C.; CARLOS, I. Z.; HIRUMA-LIMA, C. K. *Byrsonima fagifolia*: an integrative study to validate the gastroprotective healing, antidiarrheal, antimicrobial and mutagenic action. **Journal of Ethnopharmacology**, v.120, p.-149-160, 2008.
- LIRA, W. M.; DOS SANTOS, F. V.; SANNOMIYA, M.; RODRIGUES, C. M.; VILEGAS, W.; VARANDA, E. A.. Modulatory effect of *Byrsonima basiloba* extracts on the mutagenicity of certain direct and indirect-acting mutagens in *Salmonella typhimurium* assays. **Journal of Medicinal Food**, v. 11, p. 111-119, 2008.
- LOH, D. S. Y.; ER, H. M.; CHEN, Y. S. Mutagenic and antimutagenic activities of aqueous and methanol extracts of *Euphorbia hirta*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 126, p. 406 - 414, 2009.
- LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa: Plantarum. 1998. v. 2, 352p.
- MARON, D. M.; AMES, B. N. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. **Mutation Research**, v. 113, p. 173-215, 1983.
- MARTINEZ, A.; URIOS, A.; BLANCO, M. Mutagenicity of 80 chemicals in *Escherichia coli* tester strains IC203, deficient in OxyR, and its oxyR<sup>+</sup> parent WP2 *uvrA*/pKM101: detection of 31 oxidative mutagens. **Mutation Research**, v. 467, p.41-53, 2000.

- MAZZOLIN, L. P.; NASSER, A. L. M.; MORAES, T. M.; SANTOS, R. C.; NISHIJIMA, C. M.; SANTOS, F. V.; VARANDA, E. A.; BAUAB, T. M.; DA ROCHA, L. R. M.; DI STASI, L. C.; VILEGAS, W.; HIRUMA-LIMA, C. A. *Qualea parviflora* Mart.: An integrative study to validate the gastropotective, antidiarrheal, antihemorrhagic and mutagenic action. **Journal of ethnopharmacology**, v. 127, p.508-514, 2010.
- MENDANHA, D. M.; FERREIRA, H. D.; FELÍCIO, L. P.; SILVA, E. M.; PEREIRA, D. G.; NUNES, W. B.; CARVALHO, S. Modulatory effect of *Byrsonima verbascifolia* (Malpighiaceae) against damage induced by doxorubicin in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Genetics and Molecular Research**, v. 9, p.69 -77, 2010.
- MICHEL, T.; HALABALAKI, M.; SKALTSOUNIS, A. L. New concepts, experimental approaches, and dereplication strategies for the discovery of novel phytoestrogens from natural sources. **Planta Medica**, v.79, p.514-532, 2013.
- MICHELIN, D. C.; SANNOMIYA, M.; FIGUEIREDO, M. E.; RINALDO, D.; DOS SANTOS, L. C.; SOUZA-BRITO, A. R. M.; VILEGAS, W.; SALGADO, H. R. N. Antimicrobial activity of *Byrsonima* species (Malpighiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Supl.18, p.690-695, 2008.
- MIYAZAWA, M.; OKUNO, Y.; IMANISHI, K. Suppression of the SOS-Inducing Activity of Mutagenic Heterocyclic Amine, Trp-P-1, by Triterpenoid from *Uncaria sinensis* in the *Salmonella typhimurium* TA1535/pSK1002 *Umu* Test. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p.2312-2315, 2005.
- MORALES, C.; GÓMEZ-SERRANILLOS, M. P.; IGLESIAS, I.; VILLAR, A. M.; CÁCERES, A. Preliminary screening of five ethnomedicinal plants of Guatemala. **Il Farmaco**, v. 56, p. 523-526, 2001.
- MOREIRA, L. Q.; VILELA, F.C.; ORLANDI, L.; DIAS, D. F.; SANTOS, A. L. A.; DA SILVA, M. A.; PAIVA, R.; ALVES-DA-SILVA, G.; GIUSTI-PAIVA, A. Anti-inflammatory effect of extract and fractions from the leaves of *Byrsonima intermedia* A. Juss. in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 138, p. 610–615, 2011.
- MORFFI, J.; RODEIRO, I.; HERNÁNDEZ, S. L.; GONZÁLEZ, L.; HERRERA, J.; ESPINOSA-AGUIRRE, J. J. Antimutagenic properties of *Mangifera indica* L. Stem Bark Extract and Evaluation of its Effects on Hepatic CYP1A1. **Plant foods for human nutrition**, v.67, p.223-228, 2012.

- MORTELMANS, K.; ZEIGER, E. The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. **Mutation Research**, v. 455, p. 29 - 60, 2000.
- NAMASIVAYAM, N. Chemoprevention in experimental animal. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1215, p.60-71, 2011.
- NEIGI, P. S.; JAYAPRAKASHA, G. K.; JENA, B. S. Antioxidant and antimutagenic activities of pomegranate peel extracts. **Food Chemistry**, v. 80, p. 393 – 397, 2003.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 5. ed, Porto Alegre: Artmed, 2011. 1274 p.
- NIIKAWA, M.; HAYASHI, H.; SATO, T.; NAGASE, H.; KITO, H. Isolation of substances from glossy privet (*Ligustrum lucidum* Ait.) inhibiting the mutagenicity of benzo(a)pyrene in bacteria. **Mutation Reserarch**, v.319, p.1-9, 1993.
- NOGUEIRA, R.C.; PAIVA, R.; DE OLIVEIRA, L. M.; SOARES, G. A.; SOARES, F. P.; CASTRO, A. H. F.; PAIVA, P. D. O. Calli induction from leaf explants of murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). **Ciência e agrotecnologia**, v. 31, p. 366–370, 2007.
- NOGUEROL, T.-N.; BORONAT, S.; JARQUE, S.; BARCELÓ, D.; PIÑA, B. Detection of hormone receptor ligands in yeast by fluorogenic methods. **Talanta**, v. 69, p.351-358, 2006.
- OLIVEIRA, A. P. S.; DE SOUSA, J. F.; DA SILVA, M. A.; HILÁRIO, F.; RESENDE, F. A.; CAMARGO, M. S.; VILEGAS, W.; DOS SANTOS, L. C.; VARANDA, E. A. Estrogenic and chemopreventive activities of xanthenes and flavones of *Syngonanthus* (Eriocaulaceae). **Steroids**, v.78, p.1053-1063, 2013.
- PANIZZA, S. Plantas que Curam: Cheiro de Mato. 3ed. IBRASA, São Paulo, 1998.
- PARK, K. Y.; JUNG, G. O.; LEE, K. L.; CHOI, J.; CHOI, M. Y.; KIM, G. T.; JUNG, H. F.; PARK, H. J. Antimutagenic activity of flavonoids from the heartwood of *Rhus verniciflua*. **Journal of ethnopharmacology**, v. 90, p.73-79, 2004.
- PARRELLA, A.; LAVORGNA, M.; CRISCUOLO, E.; ISIDORI, M. Mutagenicity, Genotoxicity, and Estrogenic activity of River Porewaters. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00244-013-9928-y>. [Epub ahead of print].

- PATISAUL, H. B.; JEFFERSON, W. The pros and cons of phytoestrogens. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 31, p.400-419, 2010.
- PEREZ-GUTIERREZ, R. M.; MUÑIZ-RAMIREZ, A.; GOMEZ, Y. G.; RAMIREZ, E. B. Antihyperglycemic, Antihyperlipidemic and Antiglycation Effects of *Byrsonima crassifolia* Fruit and Seed in Normal and Streptozotocin - Induced Diabetic Rats. **Plant Foods for Human Nutrition**, vol. 65, p. 350 – 357, 2010.
- Portal da Saúde-Ministério da Saúde. Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. 2009. Disponível em : <[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/plantas\\_medicinais.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/plantas_medicinais.pdf)>. Acesso em: 04 abr.2013.
- Portal da Saúde- Ministério da Saúde. Fitoterápicos são alternativas de tratamento no SUS. 2012. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/noticia/8061/162/fitoterapicos-sao-alternativa-de-tratamento-no-sus.html>>. Acesso em 04 abr.2013
- POSADZKI, P.; LEE, M. S.; MOON, T. W.; CHOI, T. Y.; PARK, T. Y.; ERNST, E. Prevalence of complementary and alternative medicine (CAM) use by menopausal women: A systematic review of surveys. **Maturitas**, v. 75, p.34-43, 2013.
- PRIETO, A. M.; DOS SANTOS, A. G.; OLIVEIRA, A. P. S.; CAVALHEIRO, A. J.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; VARANDA, E. A.; SOARES, C. P. Assessment of the chemopreventive effect of casearin B, a clerodane diterpene extracted from *Casearia sylvestris* (Salicaceae). **Food and Chemical Toxicology**, v. 53, p. 153-159, 2013.
- RAJENDRAN, K. G.; LOPES, T.; PARIKH, I. Estrogenic effect of phenol red in MCF-7 cells ins achieved through activation of estrogen receptor by interacting with a site distinct from the steroid binding site. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 142, p. 724-731, 1987.
- RASMUSSEN, T. H.; NIELSEN, J. B.; Critical parameters in the MCF-7 cell proliferation bioassay (E-Screen). **Biomarkers**, v.7, p.322-336, 2002.
- RATES, S.M.K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, vol 39, p.603-613, 2001.
- RESENDE, F. A. Estudo do potencial antimutagênico, mutagênico, estrogênico e antibacteriano de flavonóides. Araraquara, SP: 2011. Disponível em: <http://www2.fcfar.unesp.br/Home/Pos-graduacao/BiocienciaeBiotecnologiasAplicadasaFarmacia/Flavia%20Aparecida%20Resende.pdf>. Acesso em: 10 maio 2013, 13:36.

- RESENDE, F. A.; BARCALA, C. A. M. A.; FARIA, M. C. S.; KATO, F. H.; CUNHA, W. R.; TAVARES, D. C. Antimutagenicity of ursolic acid and oleanolic acid against doxorubicin-induced clastogenesis in Balb/c mice. **Life Sciences**, v. 79, p.1268-1273, 2006.
- RESENDE, F. A.; MUNARI, C. C.; MONTEIRO NETO, M. A. B.; TAVARES, D. C.; BASTOS, J. K.; DA SILVA FILHO, A. A.; VARANDA, E. A. Compartarive Studies of the (Anti) Mutagenicity of *Baccharis dracunculifolia* and Artepillin C by the Bacterial Reverse Mutation Test. **Molecules**, v. 17, p.2335-2350, 2012.
- RESENDE, F. A.; OLIVEIRA, A. P. S.; CAMARGO, M. S.; VILEGAS, W.; VARANDA, E. A. Evaluation of Estrogenic Potential of Flavonoids Using a Recombinant Yeast Strain and MCF7/BUS Cell Proliferation Assay. **Plos one**, v. 8, 7p, 2013.
- 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.
- RIETJENS, I. M. C. M.; BOERSMA, M. G.; VAN DER WOUDE, H.; JEURISSEN, S. M. F.; SCHUTTE, M. E.; ALINK, G. M. Flavonoids and alkenylbenzenes: Mechanisms of mutagenic action and carcinogenic risk. **Mutation Research**, v. 574, p.124-138, 2005.
- RINALDO, D.; BATISTA JR, J. M.; RODRIGUES, J.; BENFATTI, A. C.; RODRIGUES, C. M.;DOS SANTOS, L. C.; FURLAN, M.; VILEGAS, W. Determination of Catechin Diastereomers from the Leaves of *Byrsonima* species Using Chiral HPLC-PAD-CD. **Chirality**, v.22, p.726-733, 2010.
- RODRIGUES, P. A.; MORAIS, S. M.; SOUZA, C. M.; MAGALHÃES, D. V.; VIEIRA, I. G. P.; ANDRADE, G. M.; RAO, V. S.; SANTOS, F. A. Gastroprotective effect of *Byrsonima sericea* DC leaf extract against ethanol-induced gastric injury and its possible mechanisms of action. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.84, p.113-122, 2012.
- SAEIDNIA, S.; ABDOLLAHI, M. Antioxidants: Friends or foe in prevention or treatment of cancer: The debate of the century. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 271, p. 49-63, 2013.
- SANDER, M.; STEFFEN, J.; VOSS, W. A. Vegetais úteis às aves. **Natureza em Revista**, Porto Alegre, v. 4, p. 47-58, 1978.
- SANNOMIYA, M.; CARDOSO, C. R. P.; FIGUEIREDO, M. E.; RODRIGUES, C. M.; DOS SANTOS, L. C.; DOS SANTOS, F. V.; SERPELONI, J. M.;



- CÓLUS, I. M. S.; VILEGAS, W.; VARANDA, E. A. Mutagenic evaluation and chemical investigation of *Byrsonima intermedia* A. Juss. leaf extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 112, p. 319 -326, 2007.
- SANNOMIYA, M.; FONSECA, V. B.; DA SILVA, M. A.; ROCHA, L. R. M.; DOS SANTOS, L. C.; HIRUMA-LIMA, C. A.; SOUZA BRITO, A. R. M.; VILEGAS, W. Flavonoids and antiulcerogenic activity from *Byrsonima crassa* leaves extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, p.1 - 6, 2005a.
  - SANNOMIYA, M.; MICHELIN, D. C.; RODRIGUES, C. M.; SANTOS, L. C.; SALGADO, H. R. N.; HIRUMA-LIMA, C. A.; BRITO, A. R. S. M.; VILEGAS, W. *Byrsonima crassa* Niedenzu (IK): antimicrobial activity and chemical study. **Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences**, v.26, p;71-75, 2005b.
  - SANNOMIYA, M.; RODRIGUES, C. M.; COELHO, R. G.; DOS SANTOS, L. C.; HIRUMA-LIMA, C. A.; SOUZA BRITO, A. R. M.; VILEGAS, W. Application of preparative high-speed counter-current chromatography for the separation of flavonoids from the leaves of *Byrsonima crassa* Niedenzu (IK). **Journal of chromatographya**, v. 1035, p.47-51, 2004.
  - SANTOS, F. V.; NASSER, A. L. M; BISO, F. I.; MOREIRA, L. M.; SANTOS, V. J. S. V.; VILEGAS, W.; VARANDA, E. A. Genotoxicity of polar and apolar extracts obtained from *Qualea multiflora* and *Qualea grandiflora*. **Journal of ethnopharmacology**, v. 138, p. 105-110, 2011.
  - SASAKI, Y. F.; IMANISHI, H.; OHTA, T.; WATANABE, M.; MATSUMOTO, K.; SHIRASU, Y. Supressing effect of tannic acido n the frequencies of mutagen-induced sister-chromatid exchanges in mammalian cells. **Mutation research**, v. 213, p.195-203, 1989.
  - SEN, S.; BHOJNAGARWALA, P.; FRANCEY, L.; LU, D.; PENNING, T. M.; FIELD, J. p53 Mutagenesis by Benzo[a]pyreno Derived Radical Cations. **Chemical Research in Toxicology**, v. 25, p.2117-2126, 2012.
  - SILVA, C. R.; MONTEIRO, M. R.; ROCHA, H. M.; RIBEIRO, A. F.; CALDEIRA-DE-ARAUJO, A.; LEITÃO, A. C.; BEZERRA, R. J. A. C.; PÁDULA, M. Assessment of antimutagenic and genotoxic potential of senna (*Cassia angustifólia* Vahl.) aqueous extract using in vitro assays. **Toxicology in vitro**, v.22, p. 212-218, 2008.
  - SILVA, E. M.; SOUZA, J. N. S.; ROGEZ, H.; REES, J. F.; LARONDELLE, Y. Antioxidant activities and polyphenolic contents of fifteen selected plant species from the Amazonian region. **Food Chemistry**, v. 101, p. 1012-1018, 2007.

- SKEHAN, P.; STORENG, R.; SCUDIERO, D.; MONKS, A.; MCMAHON, J.; VISTICA, D.; WARREN, JT, BOKESCH, H.; KENNEY, S.; BOYD, M. R. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. **J. Natl. Cancer Inst**, v.82, p.1107-1112, 1990.
- SOTO, A. M.; SONNENSCHNEIN, C.; CHUNG, K. L.; FERNANDEZ, M. F.; OLEA, N.; SERRANO, F. O. The E-SCREEN Assay as a Tool to Identify Estrogens: An Update on Estrogenic Environmental Pollutants. **Environ Health Perspect**, v.103, p.113-122, 1995.
- SOUZA, H. M. Plantas para alimentação de aves. **Boletim da ADEMA**, São Paulo, n. 13, não paginado, 1980.
- THAKUR, V. S.; DEB, G.; BABCOOK, M. A.; GUPTA, S. Plant Phytochemicals as Epigenetic Modulators: Role in Cancer Chemoprevention. **The AAPS Journal**, v. 16, p. 151-163, 2013.
- VALLILO, M. I.; PASTORE, J. A.; ESTON, M. R.; GARBELOTTI, M. L.; DE OLIVEIRA, E. Caracterização química e valor nutricional dos frutos de *Byrsonima myricifolia* Griseb (MALPIGHIACEAE) – Alimento de aves silvestres. **Revista Instituto Florestal**, São Paulo, v. 19, p. 39-45, 2007.
- WELSHONS, W. V.; WOLF, M. F.; MURPHY, C. S.; JORDAN, V. C. Estrogenic activity of phenol red. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 57, p.169-178, 1988.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Cancer. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>>. Acesso em: 04 abr.2013
- XIAO, H.; SINGH, S. V. p53 Regulates Cellular Responses to Environmental Carcinogen Benzo[a]pyrene-7,8-Diol-9,10-Epoxy in Human Lung Cancer Cells. **Cell Cycle**, v.6, p.1753-1761, 2007.
- XU, G.; REN, G.; XU, X.; YUAN, H.; WANG, Z.; KANG, L.; YU, W.; TIAN, K. Combination of curcumin and green tea catechins prevents dimethylhydrazine-induced colon carcinogenesis. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, p.390-395, 2010.
- YAMAKOSHI, J.; SAITO, M.; KATAOKA, S.; KIKUCHI, M. Safety evaluation of proanthocyanidin-rich extract from grape seeds. **Food and Chemical Toxicology**, v.40, p.599-607, 2002.
- ZEIGER, E. Mutagens that are not carcinogens: faulty theory or faulty tests? **Mutation Research**, v. 492, p. 29-38, 2001.

## ANEXO I: Lista de soluções e meios utilizados

### Ensaio de mutagenicidade:

- Caldo nutriente:

Meio Oxoid.....0,75g

Água destilada q.s.p.....30mL

Autoclavar (121°C, 15 minutos).

- Top agar:

Agar.....1,2g

NaCl.....1,0g

água destilada q.s.p.....200mL

Autoclavar (121°C, 15 minutos).

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

Biotina.....0,00247g

Histidina.....0,00192g

Água destilada (45°C) q.s.p.....20mL

Autoclavar (121°C, 15 minutos).

-Agar mínimo glicosado (AGM):

Agar.....7,5g

Água destilada.....465mL

Glicose 40%: 25mL/465mL de meio (45 mL água destilada + 20g glicose) ou Glicose 8% (50 mL de água + 4g de glicose); VB: 10 mL/465 mL de meio.

Autoclavar (121°C, 15 minutos).

- VB (Vogel Bonner E):

Sulfato de magnésio.....0,75g

Ácido cítrico.....7,5g

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

Fosfato de sódio e amônio.....13,13g

Água destilada (45°C).....50,25mL

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

Autoclavar (121°C, 15 minutos).

- Tampão fosfato (0,2 M):

Solução estoque A:

2,84g (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>).....100mL(água destilada)

Solução estoque B:

2,76g (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>).....100mLágua destilada)

Solução de uso: Misturar aproximadamente 30 mL da solução A e aproximadamente 7mL da solução B. Ajustar o pH (7,4).

Autoclavar (121°C, 15 minutos).

-Mistura S9:

Água miliQ estéril.....19,75 mL  
 Tampão fosfato.....25 mL  
 NADP (freezer).....2 mL  
 Glicose-6-fosfato (geladeira).....250 µL  
 MgCl (geladeira).....500 µL  
 KCl .....500 µL  
 Fração S9 (-80C).....Dissolvida em 2ml de água milQ estéril

- Solução de MgCl (0,4 M):

MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O.....0,1626g  
 H<sub>2</sub>O destilada.....2 mL  
 Autoclavar (121°C, 15 minutos).

- Solução de KCl (1,65M):

KCl.....0,246g  
 H<sub>2</sub>O.....2 mL  
 Autoclavar (121°C, 15 minutos).

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

G-6-P.....0,08463g  
 H<sub>2</sub>O destilada (estéril).....300 µL

- Solução NAPD (0.1 M):

NAPD.....0,15308g  
 H<sub>2</sub>O destilada (estéril).....2 mL

- Azida sódica:

10 mL água destilada estéril.....0,00025g

- 4-nitro-o-fenilenodiamina:

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

- Mitomicina C:

10 mL água destilada estéril.....0,0001g

- 2-aminoantraceno:

10 mL DMSO.....0,00025 g

- Benzo[a]pireno:  
10 mL DMSO.....0,0002g
- Aflatoxina B<sub>1</sub>  
10 mL DMSO.....0,0001g
- 2-aminofluoreno:  
10 mL DMSO.....0,00025g

### 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).
- Meio Mínimo (MM)  
Yeast Nitrogen Base.....1,7 g  
Sulfato de Amônio (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.....5 g  
Água Mili Q.....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

Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 60 mM.....8,52 g  
 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>– 40 mM..... 5,52 g  
 KCl – 10 mM.....0,75 g  
 MgSO<sub>4</sub>,7 H<sub>2</sub>O – 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,

-MgSO<sub>4</sub>. 7 H<sub>2</sub>O – 1 mM

MgSO<sub>4</sub> 7.H<sub>2</sub>O – 1 mM.....12,32g  
 Água MiliQ.....50 mL

### Ensaio com cultivos celulares:

- Meio DMEM:

DMEM (Sigma).....10g  
 NaHCO<sub>3</sub>.....1,2g  
 HEPES.....2,38g  
 Suspensão de antibiótico e antimicótico (100x)...10mL  
 Água destilada.....1000mL

O pH foi ajustado a pH a 7,2 a 7,4, com ácido clorídrico 1N (88,2% (v/v) ácido clorídrico em água destilada) ou hidróxido de sódio 1N (4% (m/v) hidróxido de sódio em água destilada).

Esterilização em sistema de filtração à vácuo, com membrana de poros de 0,22 µm de diâmetro (Corning Incorporated, Acton MA, USA) e aliqotado para ser estocado sob congelamento (-20°C).

- PBS(Phosphate Buffered Saline)

NaCl.....8g  
 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.....11,1580g  
 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.....6g  
 Água destilada.....1000mL

O pH foi ajustado a 7,0.

Autoclavar (121°C, 15 minutos).

- Solução de ácido tricloroacético 10%:

Ácido tricloroacético.....100g  
Água destilada.....1000mL  
Dissolver bem o ácido em água e armazenar a 4°C.

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

Sulforodamina-B.....0,4g  
Ácido acético 1%.....100mL

- Tampão TRIS Base 10mM, pH 10:

TRIS Base.....1,21g  
Água destilada.....1000mL  
Dissolver bem, o pH foi ajustado a 10,5 e armazenarem temperatura ambiente.

- Solução NaOH 10N:

TRIS Base.....1,21g  
Água destilada.....1000mL  
Dissolver bem e armazenar em temperatura ambiente.

- 17-β- estradiol (1mM)

17-β- estradiol.....1 mg  
Etanol absoluto P.A.....4 mL

## **CAPÍTULO II**



---

**Assunto:** Enc: Submission Confirmation for your paper

**De:** Flavia Resende (flaviabiomed@yahoo.com.br)

**Para:** liviaespanha@yahoo.com.br;

**Data:** Sexta-feira, 6 de Dezembro de 2013 12:07

---

Dear Dr.Resende,

Your submission entitled "Mutagenicity and antimutagenicity of Brazilian Byrsonima species assessed by Ames test" has been received by journal Journal of Ethnopharmacology

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to Elsevier Editorial as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/jep/>.

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Journal of Ethnopharmacology

For further assistance, please visit our customer support site at <http://help.elsevier.com/app/answers/list/p/7923>. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions and learn more about EES via interactive tutorials. You will also find our 24/7 support contact details should you need any further assistance from one of our customer support representatives.

Manuscript Number:

Title: Mutagenicity and antimutagenicity of Brazilian *Byrsonima* species assessed by Ames test

Article Type: Full Length Article

Keywords: mutagenicity; antimutagenicity; *Byrsonima* spp; Ames test.

Corresponding Author: Dr. Flavia Aparecida Resende, Ph.D

Corresponding Author's Institution: UNESP- São Paulo State University, Faculty of Pharmaceutical Sciences of Araraquara

First Author: Livia G Espanha, Ms

Order of Authors: Livia G Espanha, Ms; Flavia Aparecida Resende, Ph.D; José S Lima Neto, Dr; Paula K Boldrin, Ms; Catarine H Nogueira, Ms; Mariana S Camargo, Ph.D; Rone A De Grandis; Lourdes C Santos, Prof; Wagner Vilegas, Prof; Eliana A Varanda, Prof

Abstract: Ethnopharmacological relevance: In various regions of Brazil, several species of the genus *Byrsonima* (Malpighiaceae) are widely used to treat gastrointestinal complications. This genus has about 150 species with remarkable neotropical distribution. Studies have identified various biological activities in these plants, especially antioxidant, antimicrobial (including action against bacteria, fungi and protozoa) and topical and systemic anti-inflammatory activities. The aim of the study was to investigate the mutagenicity and antimutagenicity of ethanolic extracts of six species of *Byrsonima*: *B.verbascifolia*, *B. correifolia*, *B. coccolobifolia*, *B. ligustrifolia*, *B. fagifolia* and *B. intermedia* by the Salmonella microsome assay.

Methods: Mutagenic and antimutagenic activity was evaluated by the Salmonella/microsome assay (Ames test), with the Salmonella typhimurium tester strains TA100, TA98, TA97a and TA102, with (+S9) and without (-S9) metabolism, by the preincubation method.

Results: Only *B. coccolobifolia* and *B. ligustrifolia* showed mutagenic activity. However, *B. verbascifolia*, *B. correifolia*, *B. fagifolia* and *B. intermedia* were found to be strongly antimutagenic against at least one of the mutagens tested.

Conclusions: These results contribute to valuable data on the safe use of medicinal plants and the benefits of their chemopreventive effects.

## **Mutagenicity and antimutagenicity of Brazilian *Byrsonima* species assessed by Ames test**

Lívia G. Espanha<sup>a</sup>, Flávia A. Resende<sup>a</sup>, José S. Lima Neto<sup>b</sup>, Paula K. Boldrin<sup>a</sup>, Catarine H. Nogueira<sup>a</sup>, Mariana S. de Camargo<sup>a</sup>, Rone A. De Grandis<sup>a</sup>, Lourdes C. dos Santos<sup>b</sup>, Wagner Vilegas<sup>c</sup>, Eliana A. Varanda<sup>a</sup>

<sup>a</sup>*Department of Biological Sciences, Faculty of Pharmaceutical Sciences of Araraquara, UNESP- São Paulo State University, Rodovia Araraquara-Jaú, km 1, CEP 14801-902, Araraquara, São Paulo, Brazil*

<sup>b</sup>*Department of Organic Chemistry, Chemistry Institute of Araraquara, UNESP- São Paulo State University, Rua Francisco Degni s/n, Bairro Quitandinha, c.p. 355, CEP 14800-900, Araraquara, São Paulo, Brazil*

<sup>c</sup>*UNESP-São Paulo State University, Campus do Litoral Paulista - Unidade São Vicente, 11330-900, São Vicente, São Paulo, Brazil*

\*Corresponding author. UNESP- São Paulo State University, Department of Biological Sciences, Faculty of Pharmaceutical Sciences of Araraquara, Rodovia Araraquara-Jaú, Km 1, 14801-902, Araraquara, São Paulo, Brazil.

Tel.: +55 16 33016951; fax: +55 16 33016940

E-mail address: [flaviabiomed@yahoo.com.br](mailto:flaviabiomed@yahoo.com.br) (F. A. Resende)

## **Abstract**

*Ethnopharmacological relevance:* In various regions of Brazil, several species of the genus *Byrsonima* (Malpighiaceae) are widely used to treat gastrointestinal complications. This genus has about 150 species with remarkable neotropical distribution. Studies have identified various biological activities in these plants, especially antioxidant, antimicrobial (including action against bacteria, fungi and protozoa) and topical and systemic anti-inflammatory activities. The aim of the study was to investigate the mutagenicity and antimutagenicity of ethanolic extracts of six species of *Byrsonima*: *B. verbascifolia*, *B. correifolia*, *B. coccolobifolia*, *B. ligustrifolia*, *B. fagifolia* and *B. intermedia* by the *Salmonella* microsome assay.

*Methods:* Mutagenic and antimutagenic activity was evaluated by the *Salmonella*/microsome assay (Ames test), with the *Salmonella typhimurium* tester strains TA100, TA98, TA97a and TA102, with (+S9) and without (-S9) metabolization, by the preincubation method.

*Results:* Only *B. coccolobifolia* and *B. ligustrifolia* showed mutagenic activity. However, *B. verbascifolia*, *B. correifolia*, *B. fagifolia* and *B. intermedia* were found to be strongly antimutagenic against at least one of the mutagens tested.

*Conclusions:* These results contribute to valuable data on the safe use of medicinal plants and the benefits of their chemopreventive effects.

*Keywords:* mutagenicity; antimutagenicity; *Byrsonima* spp; Ames test.

## 1. Introduction

The use of medicinal plants in folk medicine is based on empirical knowledge gathered for centuries by diverse ethnic groups, ever since people resorted to the world around them for remedies which could alleviate pain and cure illnesses. This knowledge, based on daily experiences and passed down from generation to generation, constitutes the origin of modern medicine (De Pasquale, 1984; Mendanha et al., 2010).

One of the several reasons to take an interest in medicinal plants is that a large percentage of the world's population does not have access to conventional pharmacological treatment, and folk medicine and ecological awareness suggest that "natural" products are harmless (Rates, 2001). Thus, it is more than a habit and more than belief that impels much of the population, who cannot afford allopathic medicines, to use herbal medicine, which ends up being the only way to treat their illnesses.

At present, particularly in developing countries, medicinal plants continue to be the main source of medication. It has been estimated that approximately 80% of the world's inhabitants and 88% of the inhabitants of less developed third world countries rely mainly on traditional medicine for their primary health care systems, especially in China, Mexico, Nigeria, and Thailand (Tangjitman et al., 2013). Many living in the developed countries also have a high regard for traditional medicine as a solution, in response to the constantly increasing medical expenditure (Guo et al., 2013).

In various regions of Brazil, several species of the genus *Byrsonima* are widely used in the treatment of gastrointestinal problems. The *Byrsonima* genus (Malpighiaceae) has about 150 species with remarkable neotropical distribution. Studies have confirmed a number of different biological activities in these plants, especially antioxidant, antimicrobial (against bacteria, fungi and protozoa) and topical and systemic anti-inflammatory activities. Phytochemically, this genus has been noted for the presence of flavonoids and triterpenoids (Guilhon-Simplicio et al., 2012).

Chemicals that can induce mutations in a species can potentially damage its germ line, leading to fertility problems and to mutations in future generations. Mutagenic chemicals are also capable of inducing cancer, and this concern has driven most of the mutagenicity testing

programs (Mortelmans & Zeiger, 2000). There is increasing evidence that mutations in somatic cells are not only involved in carcinogenesis but do also play a role in the pathogenesis of other chronic degenerative diseases, such as atherosclerosis and heart diseases, which are the leading causes of death in the human population (De Flora, 1998). The identification of substances capable of inducing mutations has thus become an important procedure in safety assessment (Mortelmans & Zeiger, 2000).

On the other hand, cancer chemoprevention can be defined as the prevention, inhibition, or reversal of carcinogenesis by the administration of one or more chemical substances, either as individual drugs or as naturally occurring constituents of the diet (Namasivayam, 2011; Morse & Stoner, 1993).

In our daily life, we contacted several compounds with mutagenic potential. These compounds are present in air contaminated with pollutants from industry and traffic, in cosmetics and even in most processed foods consumed nowadays. Thus, it is interesting to identify compounds that potentially combat these mutagenic effects.

In a previous study, the methanolic extract of *Byrsonima crassa* showed mutagenic activity in the Ames test with *Salmonella typhimurium* strain TA98, without the metabolic activation system (S9), and amentoflavone, one of the metabolites isolated from the ethyl acetate fraction of this specie, gave positive results for mutagenicity (Cardoso et al., 2006). The methanolic extract of *B. intermedia* demonstrated signs of mutagenic activity in the strains TA98 and TA100 in Ames assay (Sannomiya et al., 2007).

Methanolic and chloroform extracts of *Byrsonima basiloba* were tested for mutagenicity and antimutagenicity. No mutagenic activity was observed in either extract. However, both extracts showed antimutagenic activity against direct and indirect mutagens (Lira et al., 2008).

Considering the popular use of these plants, their pharmacological potential and demonstrated activity, the risk of using medicinal extracts without detailed investigation and the need to find chemopreventive substances, the aim of this study was to assess the mutagenic and antimutagenic activity of ethanolic extracts of six species (*Byrsonima*

*verbascifolia*, *Byrsonima correifolia*, *Byrsonima coccolobifolia*, *Byrsonima ligustrifolia*, *Byrsonima fagifolia* and *Byrsonima intermedia*) by the Ames test, using direct and indirect mutagens.

## **2. Material and methods**

### **2.1. Chemicals**

Dimethylsulfoxide (DMSO), nicotinamide adenine dinucleotide phosphate sodium salt (NADP), D-glucose-6-phosphate disodium salt, magnesium chloride, L-histidine monohydrate, D-biotin, sodium azide (SAZ), 2-anthramine (2-AA), 4-nitro-o-phenylenediamine (NPD), mitomycinC (MMC), 2-aminofluorene (2-AF), benzo[a]pyrene (B[a]P) and aflatoxin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) were purchased from Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, USA). Oxoid Nutrient Broth No. 2 (Oxoid, England) was used as the bacterial culture medium. D-Glucose, magnesium sulfate, citric acid monohydrate, anhydrous dibasic potassium phosphate, sodium ammonium phosphate, monobasic sodium phosphate, dibasic sodium phosphate and sodium chloride were purchased from Merck (Whitehouse Station, NJ, USA).

### **2.2. Plant material and extraction**

Leaves of *B. coccolobifolia* were collected at Itirapina, SP, Brazil, and leaves of *B. intermedia* were collected at Pratânia, SP, Brazil. They were identified by Dr. Jorge Tamashiro of the Institute of Bioscience of the State University of Campinas (IB-UNICAMP), and dried specimens, numbered 1397 and 1426, respectively, were deposited at UNICAMP Herbarium.

Leaves of *B. correifolia* were collected at José de Freitas, PI, Brazil, by José de Sousa Lima Neto, and a specimen, numbered 27151, can be found in the Graziella Barroso Herbarium, in the Federal University of Piauí, Teresina.

Leaves of *B. fagifolia* and *B. verbascifolia* were collected at Porto Nacional, TO, Brazil. They were identified by Dr. Eduardo Ribeiro dos Santos and dried specimens,

numbered, 743 and 481, respectively, were deposited at the herbarium of the Federal University of Tocantins.

Leaves of *B. ligustrifolia* were collected at Pratânia, SP, Brazil by Dr. Luiz Fernando R. de Almeida and were authenticated by José Clemente Campos of the Institute of Bioscience of the São Paulo State University (UNESP), in Botucatu, SP. A dried specimen, number 24164, was deposited in the herbarium of the Institute.

The leaves were separated from the aerial parts of the plants, dried at 40 ° C to constant mass and then pulverized and stored in the dark, under cool, dry condition, until used.

Hydroethanolic extracts were prepared in 7: 3 (v/v) ethanol / water, in a stainless steel percolator (20 L). The leaf powder was previously swollen for 2 hours in the solvent before packing the percolator, with a solvent: leaf powder ratio of 5:1 (w/w). The percolation was performed at a moderate flow rate of 2 mL / min / kg. The solvent was eliminated from the extract in a rotatory evaporator (Heidolph Laborota 4001), equipped with low- pressure pump control with a Heidolph Rotovac Control valve. The residual water extract was dried in a Micro Module freeze-dyer (Savant Instruments Inc.). The dried extract was powdered and stored in amber bottles at 4 ° C.

### **2. 3. Mutagenicity test**

Mutagenicity was assessed by the Ames test (*Salmonella*/microsome assay), with a preincubation for 20 minutes, with (+S9) and without (-S9) metabolic activation. The *Salmonella typhimurium* tester strains, TA98, TA100, TA97a and TA102, were kindly provided by Dr. B.N. Ames (Berkeley, CA, USA) (Maron & Ames, 1983; Mortelmans & Zeiger, 2000). These strains were grown overnight from frozen cultures for 12–14h in Oxoid Nutrient Broth No. 2. The metabolic activation mixture (S9 fraction), prepared from livers of Sprague–Dawley rats treated with the polychlorinated biphenyl mixture Aroclor 1254 (500 mg/kg), was purchased from Molecular Toxicology Inc. (Boone, NC, USA) and freshly prepared before each test. The metabolic activation system consisted of 4% S9 fraction, 1% 0.4 M MgCl<sub>2</sub>, 1% 1.65 M KCl, 0.5% 1 M D-glucose-6-phosphate disodium and 4% 0.1 M



NADP, 50% 0.2 M phosphate buffer and 39.5% sterile distilled water (Maron & Ames, 1983).

To assay mutagenic activity, five different concentrations of each dry extract (in mg/plate: 0.20-16.7 for *B. verbascifolia*, 0.52-16.7 for *B. correifolia*, 0.52-16.0 for *B. coccolobifolia*, 0.02-18.0 for *B. ligustrifolia*, 0.6-5.0 for *B. fagifolia* and *B. intermedia*), dissolved in DMSO, were tested. The extract concentrations were selected on the basis of a preliminary toxicity test. In all subsequent assays, the upper limit of the dose range tested was either the highest non-toxic dose or the lowest toxic dose determined in this preliminary assay. Toxicity was detected either as a reduction in the number of histidine revertants (His<sup>+</sup>) or as a thinning of the auxotrophic background lawn.

The various concentrations of extracts to be tested were added to 0.5 mL of 0.2 M phosphate buffer or to 0.5 mL of 4% S9 mixture, plus 0.1 mL of bacterial culture and then incubated at 37°C for 20–30 min. Next, 2 mL of top agar was added and the mixture poured on to a plate containing minimal agar.

The plates were incubated at 37°C for 48 h and the His<sup>+</sup> revertant colonies were counted manually. All experiments were done in triplicate. The results were analyzed with the statistical software package Salanal 1.0 (U.S. Environmental Protection Agency, Monitoring Systems Laboratory, Las Vegas, NV, from the Research Triangle Institute, RTP, NC, USA), adopting the model of Bernstein et al. (1982). The data (revertants/plate) were assessed by means of the analysis of variance (ANOVA), followed by linear regression. The mutagenicity ratio (MR) was also calculated for each concentration tested, this being the mean number of revertants per plate with the test compound divided by the mean number of revertants per plate with the negative (solvent) control. The sample was considered mutagenic when a dose–response relationship was detected and a two-fold increase in the number of mutants ( $MR \geq 2$ ) was observed for at least one concentration (Mortelmans & Zeiger, 2000). The standard mutagens used as positive controls in experiments without the S9 mix were NPD (10 µg/plate), for TA98 and TA97a, SAZ (2.5 µg/plate) for TA100 and MMC (0.5 µg/plate) for TA102. In experiments with S9 activation, 2-AA (1.5 µg/plate) was used with TA98, TA97a and TA100 and 2-AF (5 µg/plate) with TA102. DMSO served as negative (solvent) control.

## 2.4. Antimutagenicity test

Only extracts considered non-mutagenic were subjected to this test. Employing the method of preincubation in plates, developed by Maron and Ames, (1983). Five different concentrations of extracts (in mg/plate, 0.013-2.000 for *B. verbascifolia*, 0.008-4.000 for *B. correifolia*, 0.010-0.500 for *B. fagifolia* and 0.007-0.250 for *B. intermedia*) were associated with known mutagens in tests with and without metabolic activation, using *S. typhimurium* tester strains TA98, TA100 and TA102. In the tests without metabolic activation, the mutagen NPD (10.0 µg/ plate) was used for TA98 and MMC (0.5 µg/ plate) for TA102, while in those with metabolic activation, 1.0 µg/ plate of B[a]P was used for TA98 and 0.5 µg/ plate of AFB<sub>1</sub> for TA100. The extracts were mixed with 0.5 mL of 0.2 M phosphate buffer or (for activation) 0.5 mL of 4% S9 mixture, 0.1 mL of bacterial culture and the mutagen and incubated at 37°C for 20–30 minutes. After incubation, 2 mL of top agar was added, and the content of each tube was lightly homogenized and poured onto a plate with glucose minimal agar. After solidification of the top agar, the plates were incubated for 48 hours at 37°C, and the number of revertant colonies per plate was counted. The entire assay was performed in triplicate (Lira et al., 2008; Resende et al., 2012a).

The results were analyzed with the statistical software GraphPad Prism 5. The data (revertants/plate) were assessed by analysis of variance (one-way ANOVA), followed by Tukey's test.

The antimutagenicity results were expressed as percent inhibition (the ability of the compounds to inhibit the action of the known mutagen), calculated as described by Tachino et al. (1994):

$$\text{Inhibition (\%)} = 100 - [(T/M) \times 100]$$

where T is the number of revertant colonies in the plate containing mutagen and compounds and M is the number of revertant colonies in the plate containing only the mutagen.

Results were interpreted as no antimutagenic effect when the inhibition was lower than 25%, a moderate effect for a value between 25% and 40% and strong antimutagenicity for values greater than 40% (Neigi et al., 2003; Resende et al., 2012a).

Cell viability was also determined in each antimutagenesis experiment, to assess the potential bactericidal effect of the mutagens and associations. A sample was considered bactericidal when the number of viable bacterial cells was less than 60% of that observed in the negative control (Vargas, et al., 1993; Lira et al., 2008).

### **3. Results**

#### **3.1. Mutagenicity test**

The mutagenicity was determined from the mean number of revertants/plate, the standard deviation (SD) and the MR after treatment with the five concentrations of the leaf extracts, with *S. typhimurium* strains TA98, TA100, Ta97a and TA102, with and without S9. Table 1 and Table 2 show the results for the *B. verbascifolia*, *B. correifolia*, *B. fagifolia* and *B. intermedia* extracts. None of them doubled or more than doubled the number of revertant colonies in the negative control, at any concentrations tested, in the presence or absence of S9. Thus, the mutagenic activity was considered absent from all these strains. However, *B. coccolobifolia* and *B. ligustrifolia* did demonstrate mutagenic activity. *B. coccolobifolia*, in the absence of S9, showed activity in TA98, with a dose-response relationship reaching a mutagenic ratio of 2.8. In the presence of S9, in the same strain, at all concentrations tested, this extract reached a mutagenic ratio higher than 2.0. In strain TA97a, in the presence of S9, *B. coccolobifolia* showed a dose-response relationship and reached, at the highest concentration tested, a mutagenic ratio of 1.9. *B. ligustrifolia*, in TA98 without S9, reached a mutagenic ratio of 2.0 at the two highest concentrations tested.

#### **3.2. Antimutagenicity test**

The antimutagenicity of each extract was assessed from the mean number of revertants/plate, the standard deviation (SD) and the percent inhibition (% I) of the mutagenic activity of NPD, MMC, AFB<sub>1</sub> and B[a]P on treatment with the five concentrations of the extract. The results are displayed in Table 3 and Table 4. *B.verbascifolia* extract can be considered a strong antimutagen against NPD, as it showed more than 40% in inhibition at two of the concentrations tested. When tested with MMC, this extract did not show antimutagenic activity; however, with AFB<sub>1</sub>, all five concentrations tested showed more than

40% inhibition, and concentrations in the range of 0.25-2 mg/plate achieved 91% inhibition, thus, being considered very strongly antimutagenic. Against B[a]P, the five tested concentrations of the extract of *B. verbascifolia* also showed more than 40% inhibition and the highest concentration attained 82%, ranking it as strongly antimutagenic.

*B. correifolia* extract also showed strong antimutagenic activity against NPD, as it induced more than 40% inhibition in four of the five concentrations tested. However, against MMC, the extract was not antimutagenic. When mixed with AFB<sub>1</sub>, all five tested concentrations of the extract showed inhibition exceeding 40%, reaching 80% at one concentration. Thus, *B. correifolia* had strong antimutagenic activity. Associated with B[a]P, all five concentrations of the extract of *B. correifolia* tested showed inhibition of revertants around 80%, reaching 83% at one concentration, representing very high antimutagenicity. Although *B. correifolia* was not considered antimutagenic against MMC, it demonstrated a potential for significant reduction in the numbers of revertants. Extract of *B. fagifolia* and *B. intermedia* can be described as moderately antimutagenic against NPD, as they inhibited 36% and 30% of revertants, respectively. Against MMC, these extracts did not show antimutagenic activity. When associated with AFB<sub>1</sub>, these extracts showed 36% and 32% inhibition, respectively, and can be considered moderately antimutagenic. Associated with B[a]P, the extracts induced inhibition greater than 40%, achieving 76% and 77%, respectively, ranking them as strongly antimutagenic.

#### **4. Discussion and Conclusions**

In Brazil, plants of the genus *Byrsonima* (Malpighiaceae) represent a rich source of catechin and epicatechin derivatives. This genus is used in folk medicine for the treatment of gastric ulcers, inflammation, skin infections, fever and asthma. They are popularly known as “murici-vermelho” or “murici-cascudo” and they grow wild in the cerrado (savannah-like) vegetation of Brazil. *Byrsonima* species have been scientifically proven to possess several pharmacological activities, such as antiulcerogenic, mutagenic and antimicrobial (Rinaldo et al., 2010).

The Ames test can be used to assess the safety of taking a plant medicine, without a detailed analysis. This test is recommended for the initial screening of medicinal plants, since

studies have shown that the incidence of carcinogens identified as mutagens in such tests ranges from about 50% to 90% (Zeiger, 2001; Abdillahi, 2012).

The results of this study demonstrate an absence of mutagenic activity in extracts of *B. verbascifolia*, *B. correifolia*, *B. fagifolia* and *B. intermedia*, at all the concentrations tested on the four *S. typhimurium* strains, since the number of revertant colonies observed in each test was less than twice the number of revertant colonies in the negative control (Mortelmans & Zeiger, 2000). However, *B. coccolobifolia* extract doubled the number of revertant colonies in strain TA98, both in the presence and in the absence of metabolic activation, suggesting an ability to cause frameshift mutations, before and even after being metabolized, indicating the presence of metabolites derived from the extract capable of causing mutation. With strain TA97a, the dose-response for *B. coccolobifolia* went up to a mutagenicity ratio of 1.9, giving evidence of mutagenicity. *B. ligustrifolia* also doubled the number of revertant colonies in strain TA98 in the absence of metabolic activation and can be considered an inducer of frameshift mutations.

In a previous study we showed that a methanolic extract of *B. crassa* exhibited mutagenic activity in the Ames test. The following compounds were isolated from the acetate fraction: quercetin-3-*O*- $\beta$ -D-galactopyranoside, quercetin-3-*O*- $\alpha$ -L-arabinopyranoside, amentoflavone, methyl gallate and (+)-catechin. Among these, only amentoflavone exhibited positive mutagenicity. Therefore, this compound contributes to the mutagenic activity observed in the methanol extract (Cardoso et al., 2006).

In another study, methanol, hydromethanol and chloroform extracts of *B. intermedia* were assessed for mutagenicity by the Ames test and mutagenic activity was not observed, in any extract, but the methanol extract showed signs of mutagenicity to the strains TA98 (+S9,-S9) and TA100 (-S9). The values of the mutagenic ratio (MR) were close to 2, and the dose-response effect was significant. Phytochemical analysis of the methanol extract furnished (+)-catechin, (-)-epicatechin, quercetin-3-*O*- $\beta$ -D-galactopyranoside, methyl gallate, gallic acid, quercetin-3-*O*- $\alpha$ -L-arabinopyranoside, amentoflavone, quercetin, quercetin-3-*O*-(2''-*O*-galloyl)- $\beta$ -galactopyranoside and quercetin-3-*O*-(2''-*O*-galloyl)- $\alpha$ -arabinopyranoside (Sannomiya et al., 2007).

Comparing the compounds in the methanol extracts of *B. intermedia* with those from *B. crassa* (Sannomiya et al., 2004), similar profiles were observed, but a difference was seen in the flavonol concentration and the difference in the amentoflavone content explains the results obtained. In *B. crassa*, mutagenic activity was observed and the main compound of the extract responsible for this effect was amentoflavone (Cardoso et al., 2006). In *B. intermedia*, this biflavonol is also present, but in smaller amounts, explaining the signs of mutagenic activity obtained in the assays with *Salmonella* (Sannomiya et al., 2007).

Quercetin is a compound that is always present in *Byrsonima* extracts (Cardoso et al., 2006; Sannomiya et al., 2007; Lira et al., 2008). It is a flavonoid known for its mutagenic potential. Resende et al. (2012) showed that quercetin is highly mutagenic in TA98, TA100 and TA102. This compound has been observed to induce a mutation ratio of 20.4, suggesting that quercetin contributes to mutagenic potential of this genus.

For the ethanolic extract of *B. intermedia* and *B. fagifolia*, the results obtained in these work are also similar to results described for the methanolic extract extract (Sannomiya et al., 2007; Lima et al., 2008). This fact suggests that the methanol and ethanol extracts are similar in composition.

The detection of genotoxicity is highly advisable, so as to avoid the risk of genotoxic exposure to mutagens and carcinogens. However, some genotoxic compounds cannot be completely avoided because they are air pollutants, or some might be ingested as food contaminants. Also, some therapeutic drugs belong to an important group of genotoxic compounds. Antimutagenicity studies have been developed to diminish the risk in the event of genotoxic exposure (Arriaga-Alba et al., 2013). There have been several reports in the literature, that medicinal plants or fruit juice have components such as polyphenols, vitamins, chlorophylls, terpenes and unknown organic compounds, which are described as antimutagens and perhaps anticarcinogens (Arriaga-Alba et al., 2011).

In the present study, *B. verbascifolia* and *B. correifolia* extracts acted as strong antimutagens against NPD, inhibition up to 48% and 51% of induced revertants, respectively. *B. fagifolia* and *B. intermedia* were moderately antimutagenic, and their percentages of inhibition reached 36% and 30%. These extracts were able to prevent frameshift mutations.

When combined with MMC, none of the species could be considered antimutagenic, although, *B. correifolia* extract reduced significantly the number of revertants at several doses.

Against AFB<sub>1</sub>, *B. verbascifolia* and *B. correifolia* performed as strongly antimutagenic, reaching inhibition levels of 91% and 80% of revertants, respectively. It should be emphasized that when the concentration of the *B. verbascifolia* extract was varied, the inhibition remained at 91%, which reinforces its protective potential. *B. fagifolia* and *B. intermedia* were moderately antimutagenic in these tests, reaching 36% and 32% inhibition, respectively. This demonstrates the potential of these extracts to be used as protective agents against indirect mutagens, which require metabolic activation.

Against B[a]P all species showed strong antimutagenicity and may be able to prevent frameshift mutations. *B. verbascifolia* reached a level of inhibition of 82%, *B. correifolia* 83%, *B. fagifolia* 76% and *B. intermedia* 77%. It should be emphasized that even when varying the concentration of the *B. correifolia* extract, the percentages of inhibition remained very close to each other (at 82-83%), confirming its protective potential.

In previous studies, no mutagenic activity was observed in methanolic and chloroformic extracts of *B. basiloba*, however, both extracts showed antimutagenic activity. The highest inhibition level (89%) was obtained with the MeOH extract, in the strain TA100 in the presence of AFB<sub>1</sub>. Phytochemical analysis of these extracts revealed the presence of *n*-alkanes, lupeol, ursolic and oleanolic acid, (+)-catechin, quercetin-3-*O*- $\alpha$ -L-arabinopyranoside, gallic acid, methyl gallate, amentoflavone, quercetin, quercetin-3-*O*-(2''-*O*-galloyl)- $\beta$ -D-galactopyranoside, and quercetin-3-*O*-(2''-*O*-galloyl)- $\alpha$ -L-arabinopyranoside (Lira et al., 2008).

Despite the fact that the biflavonoid amentoflavone showed mutagenic activity, the amount of this compound found in the MeOH extract of *B. basiloba* (1.79 mg/g of methanolic extract) was much smaller than that found in the *B. crassa* (17.04 mg/g of methanolic extract) and *B. intermedia* (13.70 mg/g of methanolic extract) extracts (Lira et al., 2008; Sannomiya et al., 2007).

Rinaldo et al. (2010) demonstrated that in methanolic extracts and infusions from the leaves of five *Byrsonima* species, only in *B. coccolobifolia* was it not possible to observe the presence of catechins and epicatechins. In the other four species analyzed, it was found that the methanolic extracts showed larger amounts of catechins than infusions, per gram of leaves. *B. basiloba* showed the highest concentration of catechin diastereomers, followed by *B. verbascifolia*, *B. crassa* and *B. intermedia*.

The results of this study are in agreement with those in previously mentioned work. *B. verbascifolia* and *B. intermedia* did not exhibit mutagenic activity, nor did *B. basiloba basiloba* (Lira et al., 2008), but all of them are antimutagenic and showed high concentrations of catechins (Rinaldo et al., 2010), suggesting that catechins are important in the antimutagenic activity. This point is in agrees with a study that claims that catechins are already known for their antimutagenic and cancer preventive properties (Baumeister et al., 2012; Xu et al., 2010).

The phytochemistry of all species in the genus *Byrsonima* is similar; we suggest that all species possess amentoflavone and quercetin, but in different amounts. Probably, *B. coccolobifolia* and *B. ligustrifolia* possess higher concentrations of amentoflavone or quercetin, because they were mutagenic, but all the other species studied here probably possess a lower concentration of theses flavonoids.

Finally, we have to emphasize the excellent chemopreventive ability of these extracts, especially with respect to compounds that require metabolic activation. It is important to continue phytochemical studies with ethanolic extracts, to provide the chemical context of the species. All extracts evaluated were considered as strongly antimutagenic against at least one of the tested mutagens.

The study of medicinal plants should be encouraged, because while many beneficial properties are confirmed or discovered, as shown here, some species may pose risks to users.

### **Conflict of Interest Statement**

The authors declare no conflicts of interest



**Acknowledgements**

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). We also thank Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for grants to L.C. Santos, E.A. Varanda and W. Vilegas.

**Table 1.** Mutagenic activity expressed as the number of revertants/plate  $\pm$  standard deviation and MR (in brackets) of ethanolic extracts of *B. verbascifolia*, *B. correifolia* and *B. coccolobifolia*, in the presence (+S9) and absence (-S9) of metabolic activation, with the strains TA98, TA100, TA97a and TA102 of *S. typhimurium*.

	Treatment (mg/plate)	TA98		Treatment (mg/plate)	TA100		Treatment (mg/plate)	TA97a		Treatment (mg/plate)	TA102	
		- S9	+ S9		- S9	+ S9		- S9	+ S9		- S9	+ S9
<i>B. verbascifolia</i>	<b>0.00<sup>a</sup></b>	17 $\pm$ 4	68 $\pm$ 1	<b>0.00<sup>a</sup></b>	113 $\pm$ 16	114 $\pm$ 11	<b>0.00<sup>a</sup></b>	81 $\pm$ 6	121 $\pm$ 20	<b>0.00<sup>a</sup></b>	381 $\pm$ 43	341 $\pm$ 34
	<b>2.09</b>	15 $\pm$ 3 (0.9)	67 $\pm$ 2 (1.0)	<b>0.38</b>	91 $\pm$ 8 (0.8)	121 $\pm$ 12(1.1)	<b>0.20</b>	78 $\pm$ 3 (1.0)	137 $\pm$ 16(1.1)	<b>0.38</b>	369 $\pm$ 3 (1.0)	387 $\pm$ 20(1.1)
	<b>4.17</b>	24 $\pm$ 6 (1.4)	75 $\pm$ 5 (1.1)	<b>0.75</b>	107 $\pm$ 20 (1.0)	124 $\pm$ 10 (1.1)	<b>0.39</b>	97 $\pm$ 2(1.2)	140 $\pm$ 10(1.2)	<b>0.75</b>	305 $\pm$ 16 (0.8)	445 $\pm$ 32(1.3)
	<b>8.35</b>	18 $\pm$ 6 (1.0)	81 $\pm$ 3 (1.2)	<b>1.5</b>	106 $\pm$ 2 (0.9)	99 $\pm$ 4 (0.9)	<b>0.78</b>	117 $\pm$ 2(1.4)	146 $\pm$ 7(1.2)	<b>1.5</b>	368 $\pm$ 36 (1.0)	353 $\pm$ 29(1.0)
	<b>12.53</b>	23 $\pm$ 3 (1.3)	61 $\pm$ 4 (0.9)	<b>2.25</b>	105 $\pm$ 4 (0.9)	104 $\pm$ 5 (0.9)	<b>1.12</b>	109 $\pm$ 6 (1.3)	166 $\pm$ 12(1.4)	<b>2.25</b>	322 $\pm$ 45 (0.9)	344 $\pm$ 45(1.0)
	<b>16.70</b>	29 $\pm$ 12 (1.7)	50 $\pm$ 1 (0.7)	<b>3.00</b>	110 $\pm$ 9, (1.0)	93 $\pm$ 3 (0.8)	<b>1.56</b>	94 $\pm$ 5 (1.2)	169 $\pm$ 39(1.4)	<b>3.00</b>	373 $\pm$ 11 (1.0)	350 $\pm$ 27(1.0)
	C +	720 $\pm$ 28 <sup>b</sup>	500 $\pm$ 32 <sup>c</sup>	C +	1375 $\pm$ 35 <sup>d</sup>	1387 $\pm$ 37 <sup>c</sup>	C +	1115 $\pm$ 25 <sup>b</sup>	1450 $\pm$ 70 <sup>c</sup>	C +	1468 $\pm$ 53 <sup>c</sup>	1403 $\pm$ 33 <sup>f</sup>
	<b>0.00<sup>a</sup></b>	20 $\pm$ 4	68 $\pm$ 1	<b>0.00<sup>a</sup></b>	93 $\pm$ 6	114 $\pm$ 11	<b>0.00<sup>a</sup></b>	172 $\pm$ 2	99 $\pm$ 1	<b>0.00<sup>a</sup></b>	352 $\pm$ 30	435 $\pm$ 43
<i>B. correifolia</i>	<b>2.09</b>	16 $\pm$ 3 (0.8)	86 $\pm$ 6 (1.3)	<b>0.52</b>	73 $\pm$ 3 (0.8)	103 $\pm$ 5 (0.9)	<b>0.52</b>	185 $\pm$ 6 (1.1)	85 $\pm$ 4 (0.9)	<b>0.52</b>	397 $\pm$ 11 (1.1)	608 $\pm$ 45(1.4)
	<b>4.17</b>	18 $\pm$ 2 (0.9)	80 $\pm$ 3 (1.2)	<b>1.04</b>	90 $\pm$ 10 (1.0)	106 $\pm$ 8 (0.9)	<b>1.04</b>	165 $\pm$ 11 (1.0)	123 $\pm$ 11 (1.3)	<b>1.04</b>	386 $\pm$ 33 (1.1)	564 $\pm$ 35 (1.3)
	<b>8.35</b>	27 $\pm$ 3 (1.3)	66 $\pm$ 6 (1.0)	<b>2.09</b>	93 $\pm$ 8 (1.0)	96 $\pm$ 9 (0.8)	<b>2.09</b>	166 $\pm$ 18 (1.0)	135 $\pm$ 4 (1.4)	<b>2.09</b>	413 $\pm$ 16 (1.2)	484 $\pm$ 33 (1.1)
	<b>12.53</b>	37 $\pm$ 10 (1.8)	62 $\pm$ 3 (0.9)	<b>3.13</b>	94 $\pm$ 11(1.0)	115 $\pm$ 12 (1.0)	<b>3.13</b>	186 $\pm$ 5 (1.1)	110 $\pm$ 4 (1.1)	<b>3.13</b>	333 $\pm$ 50 (1.0)	354 $\pm$ 38 (0.8)
	<b>16.70</b>	31 $\pm$ 6(1.5)	60 $\pm$ 9 (0.9)	<b>4.17</b>	65 $\pm$ 6 (0.7)	94 $\pm$ 4 (0.8)	<b>4.17</b>	143 $\pm$ 10 (0.8)	134 $\pm$ 5 (1.4)	<b>4.17</b>	285 $\pm$ 21 (0.8)	322 $\pm$ 32(0.7)
	C +	730 $\pm$ 28 <sup>b</sup>	500 $\pm$ 32 <sup>c</sup>	C +	1250 $\pm$ 35 <sup>d</sup>	700 $\pm$ 37 <sup>c</sup>	C +	950 $\pm$ 25 <sup>b</sup>	1450 $\pm$ 70 <sup>c</sup>	C+	1468 $\pm$ 53 <sup>c</sup>	1403 $\pm$ 33 <sup>f</sup>
	<b>0.00<sup>a</sup></b>	37 $\pm$ 8	24 $\pm$ 4	<b>0.00<sup>a</sup></b>	112 $\pm$ 13	92 $\pm$ 9	<b>0.00<sup>a</sup></b>	172 $\pm$ 2	123 $\pm$ 15	<b>0.00<sup>a</sup></b>	406 $\pm$ 11	341 $\pm$ 34
	<b>2.0</b>	56 $\pm$ 3*(1.5)	56 $\pm$ 6**(2.3)	<b>0.52</b>	115 $\pm$ 10 (1.0)	102 $\pm$ 12(1.1)	<b>0.52</b>	129 $\pm$ 15 (0.7)	144 $\pm$ 11 (1.2)	<b>0.52</b>	345 $\pm$ 8(0.9)	386 $\pm$ 17(1.1).
<b>4.0</b>	61 $\pm$ 8* (1.7)	51 $\pm$ 1**(2.1)	<b>1.04</b>	135 $\pm$ 18 (1.2)	115 $\pm$ 7(1.3)	<b>1.04</b>	145 $\pm$ 10 (0.8)	163 $\pm$ 11(1.3)	<b>1.04</b>	338 $\pm$ 13(0.8)	466 $\pm$ 12 (1.4)	
<b>8.0</b>	70 $\pm$ 9*(1.9)	67 $\pm$ 13*(2.8)	<b>2.09</b>	154 $\pm$ 25 (1.4)	110 $\pm$ 11(1.2)	<b>2.09</b>	175 $\pm$ 15 (1.0)	208 $\pm$ 29* (1.7)	<b>2.09</b>	350 $\pm$ 23(0.9)	330 $\pm$ 24(1.0)	
<b>12.00</b>	102 $\pm$ 10**(2.8)	64 $\pm$ 9**(2.6)	<b>3.13</b>	170 $\pm$ 14 (1.5)	108 $\pm$ 8(1.2)	<b>3.13</b>	214 $\pm$ 5 (1.2)	215 $\pm$ 13**(1.8)	<b>3.13</b>	355 $\pm$ 13(0.9)	297 $\pm$ 8(0.9)	
<b>16.00</b>	67 $\pm$ 10*(1.9)	63 $\pm$ 13*(2.6)	<b>4.17</b>	143 $\pm$ 27 (1.3)	115 $\pm$ 18(1.3)	<b>4.17</b>	190 $\pm$ 7 (1.1)	237 $\pm$ 34*(1.9)	<b>4.17</b>	358 $\pm$ 10(0.9)	261 $\pm$ 2(0.8)	
C+	531 $\pm$ 28 <sup>b</sup>	500 $\pm$ 30 <sup>c</sup>	C +	1375 $\pm$ 35 <sup>d</sup>	700 $\pm$ 38 <sup>c</sup>	C+	1115 $\pm$ 25 <sup>b</sup>	700 $\pm$ 30 <sup>c</sup>	C +	1143 $\pm$ 28 <sup>c</sup>	1403 $\pm$ 33 <sup>f</sup>	

<sup>a</sup>Negative Control: (DMSO), 100  $\mu$ L/plate; Positive Control (C +): <sup>b</sup> NPD, 10  $\mu$ g/plate; <sup>c</sup> 2-AA, 1.5  $\mu$ g/plate; <sup>d</sup>SAZ, 2.5  $\mu$ g/plate, <sup>e</sup>MMC, 0.5  $\mu$ g/plate; <sup>f</sup>2-AF, 5  $\mu$ g/plate. \* p<0.05, \*\*p<0.01 (ANOVA)

**Table 2.** Mutagenic activity expressed as the number of revertants/plate  $\pm$  standard deviation (SD) and mutagenicity ratio (in brackets) of ethanolic extracts of *B. ligustrifolia*, *B. fagifolia* and *B. intermedia*, in the presence (+S9) and absence (-S9) of metabolic activation, with the strains TA98, TA100, TA97a and TA102 of *S. typhimurium*.

	Treatment (mg/plate)	TA98		Treatment (mg/plate)	TA100		Treatment (mg/plate)	TA97a		Treatment (mg/plate)	TA102	
		- S9	+ S9		- S9	+ S9		- S9	+ S9		- S9	+ S9
<i>B. ligustrifolia</i>	<b>0.00<sup>a</sup></b>	18 $\pm$ 3	24 $\pm$ 4	<b>0.00<sup>a</sup></b>	210 $\pm$ 33	87 $\pm$ 15	<b>0.00<sup>a</sup></b>	110 $\pm$ 9	115 $\pm$ 1	<b>0.00<sup>a</sup></b>	262 $\pm$ 25	407 $\pm$ 30
	<b>2.25</b>	21 $\pm$ 1 (1.2)	22 $\pm$ 5(0.9)	<b>0.08</b>	226 $\pm$ 13 (1.1)	114 $\pm$ 13(1.3)	<b>0.16</b>	106 $\pm$ 5 (1.0)	132 $\pm$ 12(1.2)	<b>0.02</b>	330 $\pm$ 16 (1.3)	379 $\pm$ 45(0.9)
	<b>4.50</b>	22 $\pm$ 1 (1.3)	27 $\pm$ 8 (1.1)	<b>0.16</b>	211 $\pm$ 12 (1.0)	98 $\pm$ 6(1.1)	<b>0.31</b>	109 $\pm$ 8(1.0)	136 $\pm$ 8(1.2)	<b>0.04</b>	232 $\pm$ 2 (0.9)	382 $\pm$ 21(0.9)
	<b>9.00</b>	20 $\pm$ 2 (1.1)	38 $\pm$ 7 (1.6)	<b>0.31</b>	224 $\pm$ 37(1.1)	90 $\pm$ 9 (1.0)	<b>0.62</b>	127 $\pm$ 7(1.2)	132 $\pm$ 19(1.2)	<b>0.08</b>	244 $\pm$ 25 (0.9)	411 $\pm$ 20(1.0)
	<b>13.50</b>	35 $\pm$ 6* (2.0)	34 $\pm$ 9 (1.4)	<b>0.47</b>	227 $\pm$ 24 (1.1)	94 $\pm$ 3 (1.1)	<b>0.94</b>	90 $\pm$ 6 (0.8)	145 $\pm$ 17(1.3)	<b>0.12</b>	243 $\pm$ 22 (0.9)	395 $\pm$ 12(1.0)
	<b>18.00</b>	36 $\pm$ 5* (2.0)	32 $\pm$ 2 (1.3)	<b>0.62</b>	209 $\pm$ 11 (1.0)	93 $\pm$ 16 (1.1)	<b>1.25</b>	121 $\pm$ 1 (1.1)	133 $\pm$ 4(1.2)	<b>0.16</b>	258 $\pm$ 11 (1.0)	328 $\pm$ 15(0.8)
	C +	300 $\pm$ 12 <sup>b</sup>	227 $\pm$ 16 <sup>c</sup>	C +	919 $\pm$ 17 <sup>d</sup>	987 $\pm$ 32 <sup>c</sup>	C +	1110 $\pm$ 32 <sup>b</sup>	1036 $\pm$ 41 <sup>c</sup>	C +	1349 $\pm$ 45 <sup>e</sup>	1464 $\pm$ 43 <sup>f</sup>
<i>B. fagifolia</i>	<b>0.0<sup>a</sup></b>	23 $\pm$ 2	22 $\pm$ 3	<b>0.0<sup>a</sup></b>	124 $\pm$ 10	100 $\pm$ 7	<b>0.0<sup>a</sup></b>	154 $\pm$ 10	164 $\pm$ 23	<b>0.0<sup>a</sup></b>	721 $\pm$ 39	500 $\pm$ 58
	<b>0.6</b>	26 $\pm$ 1(1.1)	28 $\pm$ 4 (1.3)	<b>0.6</b>	146 $\pm$ 13 (1.2)	121 $\pm$ 9(1.2)	<b>0.6</b>	190 $\pm$ 16 (1.2)	175 $\pm$ 21 (1.1)	<b>0.6</b>	796 $\pm$ 38 (1.1)	469 $\pm$ 67 (0.9)
	<b>1.2</b>	23 $\pm$ 3(1.0)	29 $\pm$ 2 (1.3)	<b>1.2</b>	127 $\pm$ 5(1.0)	115 $\pm$ 3(1.2)	<b>1.2</b>	172 $\pm$ 7(1.1)	176 $\pm$ 25 (1.1)	<b>1.2</b>	785 $\pm$ 31 (1.1)	532 $\pm$ 23 (1.1)
	<b>2.5</b>	27 $\pm$ 2(1.2)	24 $\pm$ 8 (1.1)	<b>2.5</b>	125 $\pm$ 18 (1.0)	126 $\pm$ 9(1.3)	<b>2.5</b>	171 $\pm$ 16 (1.1)	194 $\pm$ 11 (1.2)	<b>2.5</b>	756 $\pm$ 25 (1.0)	520 $\pm$ 54 (1.0)
	<b>3.7</b>	38 $\pm$ 8* (1.7)	25 $\pm$ 2 (1.1)	<b>3.7</b>	139 $\pm$ 23 (1.1)	117 $\pm$ 24 (1.2)	<b>3.7</b>	176 $\pm$ 12 (1.1)	184 $\pm$ 6(1.1)	<b>3.7</b>	661 $\pm$ 47 (0.9)	473 $\pm$ 69 (0.9)
	<b>5.0</b>	38 $\pm$ 6* (1.7)	29 $\pm$ 4 (1.3)	<b>5.0</b>	155 $\pm$ 5(1.3)	107 $\pm$ 10 (1.1)	<b>5.0</b>	172 $\pm$ 11 (1.1)	176 $\pm$ 20 (1.1)	<b>5.0</b>	677 $\pm$ 64 (0.9)	421 $\pm$ 43 (0.8)
	C+	1347 $\pm$ 88 <sup>b</sup>	1567 $\pm$ 115 <sup>c</sup>	C+	1682 $\pm$ 98 <sup>d</sup>	1956 $\pm$ 78 <sup>c</sup>	C +	1766 $\pm$ 49 <sup>b</sup>	1989 $\pm$ 89 <sup>c</sup>	C +	2656 $\pm$ 60 <sup>e</sup>	2932 $\pm$ 97 <sup>f</sup>
<i>B. intermedia</i>	<b>0.0<sup>a</sup></b>	22 $\pm$ 5	21 $\pm$ 8	<b>0.0<sup>a</sup></b>	151 $\pm$ 14	151 $\pm$ 4	<b>0.0<sup>a</sup></b>	176 $\pm$ 10	249 $\pm$ 22	<b>0.0<sup>a</sup></b>	603 $\pm$ 99	696 $\pm$ 12
	<b>0.6</b>	23 $\pm$ 3(1.0)	21 $\pm$ 7 (1.0)	<b>0.6</b>	162 $\pm$ 7(1.1)	169 $\pm$ 12 (1.1)	<b>0.6</b>	187 $\pm$ 25 (1.1)	304 $\pm$ 28 (1.2)	<b>0.6</b>	474 $\pm$ 36 (0.8)	727 $\pm$ 66 (1.0)
	<b>1.2</b>	28 $\pm$ 4(1.3)	21 $\pm$ 3 (1.0)	<b>1.2</b>	165 $\pm$ 5(1.1)	157 $\pm$ 15 (1.0)	<b>1.2</b>	228 $\pm$ 16 (1.3)	315 $\pm$ 7(1.3)	<b>1.2</b>	543 $\pm$ 19 (0.9)	680 $\pm$ 28 (1.0)
	<b>2.5</b>	30 $\pm$ 3(1.4)	17 $\pm$ 6 (0.8)	<b>2.5</b>	142 $\pm$ 10 (0.9)	160 $\pm$ 5(1.1)	<b>2.5</b>	201 $\pm$ 26 (1.1)	261 $\pm$ 18 (1.0)	<b>2.5</b>	585 $\pm$ 64 (1.0)	701 $\pm$ 60 (1.0)
	<b>3.7</b>	28 $\pm$ 1(1.3)	25 $\pm$ 8 (1.2)	<b>3.7</b>	155 $\pm$ 18 (1.0)	150 $\pm$ 4(1.0)	<b>3.7</b>	199 $\pm$ 7(1.1)	270 $\pm$ 19 (1.1)	<b>3.7</b>	645 $\pm$ 61 (1.1)	551 $\pm$ 63 (0.8)
	<b>5.0</b>	35 $\pm$ 5* (1.6)	17 $\pm$ 2 (0.8)	<b>5.0</b>	163 $\pm$ 8(1.1)	140 $\pm$ 7(0.9)	<b>5.0</b>	176 $\pm$ 23 (1.0)	261 $\pm$ 13 (1.0)	<b>5.0</b>	602 $\pm$ 53 (1.0)	481 $\pm$ 72 (0.7)
	C +	1172 $\pm$ 67 <sup>b</sup>	1236 $\pm$ 79 <sup>c</sup>	C +	1512 $\pm$ 64 <sup>d</sup>	1500 $\pm$ 88 <sup>c</sup>	C+	1196 $\pm$ 52 <sup>b</sup>	1217 $\pm$ 69 <sup>c</sup>	C+	2539 $\pm$ 187 <sup>e</sup>	2114 $\pm$ 162 <sup>f</sup>

<sup>a</sup>Negative Control: (DMSO), 100  $\mu$ L/plate; Positive Control (Control +): <sup>b</sup> NPD, 10  $\mu$ g/plate; <sup>c</sup> 2-AA, 1.5  $\mu$ g/plate; <sup>d</sup>SAZ, 2.5  $\mu$ g/plate, <sup>e</sup>MMC, 0.5  $\mu$ g/plate;

<sup>f</sup>2-AF, 5  $\mu$ g/plate. \* p<0.05 (ANOVA)

**Table 3.** Antimutagenic activity expressed as number of revertants/plate  $\pm$  standard deviation and degree of growth inhibition of revertants (%I), in combination of ethanolic extract of *B.verbascifolia* and *B. correifolia*, with direct and indirect mutagens .

Mutagens (M) Strains	NPD <sup>b</sup>		MMC <sup>c</sup>		AFB <sub>1</sub> <sup>d</sup>		B[a]P <sup>e</sup>	
	TA 98 (-S9)		TA 102 (-S9)		TA 100 (+S9)		TA 98 (+S9)	
	Treatment (mg/plate)	revertants $\pm$ SD and (%I)	Treatment (mg/plate)	revertants $\pm$ SD and (%I)	Treatment (mg/plate)	revertants $\pm$ SD and (%I)	Treatment (mg/plate)	revertants $\pm$ SD and (%I)
<i>B. verbascifolia</i>	0 <sup>a</sup>	18 $\pm$ 4	0 <sup>a</sup>	487 $\pm$ 81	0 <sup>a</sup>	114 $\pm$ 6	0 <sup>a</sup>	36 $\pm$ 5
	0.013 + M <sup>b</sup>	483 $\pm$ 40** (45)	0.094 + M <sup>c</sup>	1502 $\pm$ 138 (6)	0.125 + M <sup>d</sup>	213 $\pm$ 7*** (85)	0.049 + M <sup>e</sup>	102 $\pm$ 24*** (44)
	0.025 + M <sup>b</sup>	454 $\pm$ 60*** (48)	0.188 + M <sup>c</sup>	1296 $\pm$ 24 (19)	0.250 + M <sup>d</sup>	131 $\pm$ 27*** (91)	0.098 + M <sup>e</sup>	78 $\pm$ 6*** (57)
	0.050 + M <sup>b</sup>	550 $\pm$ 41** (37)	0.375 + M <sup>c</sup>	1366 $\pm$ 21 (15)	0.500 + M <sup>d</sup>	125 $\pm$ 16*** (91)	0.195 + M <sup>e</sup>	85 $\pm$ 9*** (54)
	0.100 + M <sup>b</sup>	628 $\pm$ 138* (28)	0.750 + M <sup>c</sup>	1380 $\pm$ 4 (14)	1.000 + M <sup>d</sup>	132 $\pm$ 13*** (91)	0.390 + M <sup>e</sup>	41 $\pm$ 5*** (78)
	0.200 + M <sup>b</sup>	1001 $\pm$ 137	1.500 + M <sup>c</sup>	1381 $\pm$ 58 (14)	2.000 + M <sup>d</sup>	132 $\pm$ 24*** (91)	0.780 + M <sup>e</sup>	34 $\pm$ 7*** (82)
	M <sup>b</sup>	876 $\pm$ 30	M <sup>c</sup>	1601 $\pm$ 226	M <sup>d</sup>	1399 $\pm$ 34	M <sup>e</sup>	184 $\pm$ 8
<i>B. correifolia</i>	0 <sup>a</sup>	18 $\pm$ 4	0 <sup>a</sup>	464 $\pm$ 48	0 <sup>a</sup>	104 $\pm$ 15	0 <sup>a</sup>	36 $\pm$ 5
	0.013 + M <sup>b</sup>	440 $\pm$ 57*** (50)	0.031 + M <sup>c</sup>	1208 $\pm$ 15 (15)	0.008 + M <sup>d</sup>	353 $\pm$ 59*** (60)	0.250 + M <sup>e</sup>	34 $\pm$ 6*** (82)
	0.025 + M <sup>b</sup>	426 $\pm$ 2*** (51)	0.063 + M <sup>c</sup>	1126 $\pm$ 66* (20)	0.016 + M <sup>d</sup>	248 $\pm$ 38*** (72)	0.500 + M <sup>e</sup>	31 $\pm$ 6*** (83)
	0.050 + M <sup>b</sup>	497 $\pm$ 39*** (43)	0.125 + M <sup>c</sup>	1152 $\pm$ 74* (19)	0.031 + M <sup>d</sup>	370 $\pm$ 118*** (58)	1.000 + M <sup>e</sup>	32 $\pm$ 6*** (82)
	0.100 + M <sup>b</sup>	593 $\pm$ 20*** (32)	0.250 + M <sup>c</sup>	1205 $\pm$ 52 (15)	0.063 + M <sup>d</sup>	180 $\pm$ 57*** (80)	2.000 + M <sup>e</sup>	31 $\pm$ 5*** (83)
	0.200 + M <sup>b</sup>	521 $\pm$ 61*** (41)	0.500 + M <sup>c</sup>	1129 $\pm$ 146* (20)	0.125 + M <sup>d</sup>	206 $\pm$ 46*** (77)	4.000 + M <sup>e</sup>	39 $\pm$ 3*** (79)
	M <sup>b</sup>	876 $\pm$ 30	M <sup>c</sup>	1414 $\pm$ 61	M <sup>d</sup>	883 $\pm$ 80	M <sup>e</sup>	184 $\pm$ 8

<sup>a</sup> Negative Control: DMSO, 100  $\mu$ L/plate; Mutagens (M): <sup>b</sup>NPD, 10  $\mu$ g/plate; <sup>c</sup>MMC, 0.5  $\mu$ g/plate; <sup>d</sup>AFB<sub>1</sub>, 0.5  $\mu$ g/plate; <sup>e</sup>B[a]P, 1  $\mu$ g/plate. \* p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.0001 (ANOVA)

**Table 4.** Antimutagenic activity expressed as number of revertants/plate  $\pm$  standard deviation and degree of growth inhibition of revertants (%I), in combination of ethanolic extract of *B. fagifolia* and *B. intermedia*, with direct and indirect mutagens.

Mutagens (M) Strains	NPD <sup>b</sup> TA 98 (-S9)		MMC <sup>c</sup> TA 102 (-S9)		AFB <sub>1</sub> <sup>d</sup> TA 100 (+S9)		B[a]P <sup>e</sup> TA 98 (+S9)	
	Treatment (mg/plate)	revertants $\pm$ SD and (%I)	Treatment (mg/plate)	revertants $\pm$ SD and (%I)	Treatment (mg/plate)	revertants $\pm$ SD and (%I)	Treatment (mg/plate)	revertants $\pm$ SD and (%I)
<i>B. fagifolia</i>	0 <sup>a</sup>	45 $\pm$ 8	0 <sup>a</sup>	355 $\pm$ 36	0 <sup>a</sup>	94 $\pm$ 12	0 <sup>a</sup>	19 $\pm$ 7
	0,030 + M <sup>b</sup>	705 $\pm$ 72 (7)	0,010 + M <sup>c</sup>	1579 $\pm$ 94	0,030 + M <sup>d</sup>	976 $\pm$ 38(8)	0,030 + M <sup>e</sup>	378 $\pm$ 49***(41)
	0,060 + M <sup>b</sup>	612 $\pm$ 43 (19)	0,030 + M <sup>c</sup>	1395 $\pm$ 70	0,060 + M <sup>d</sup>	915 $\pm$ 44(14)	0,060 + M <sup>e</sup>	405 $\pm$ 51***(37)
	0,120 + M <sup>b</sup>	623 $\pm$ 38 (17)	0,060 + M <sup>c</sup>	1499 $\pm$ 89	0,120 + M <sup>d</sup>	739 $\pm$ 40*** (31)	0,120 + M <sup>e</sup>	332 $\pm$ 35*** (48)
	0,250 + M <sup>b</sup>	593 $\pm$ 51 (21)	0,120 + M <sup>c</sup>	1432 $\pm$ 79	0,250 + M <sup>d</sup>	781 $\pm$ 52** (27)	0,250 + M <sup>e</sup>	268 $\pm$ 43*** (58)
	0,500 + M <sup>b</sup>	483 $\pm$ 40* (36)	0,250 + M <sup>c</sup>	1440 $\pm$ 65	0,500 + M <sup>d</sup>	680 $\pm$ 36*** (36)	0,500 + M <sup>e</sup>	157 $\pm$ 29*** (76)
	M <sup>b</sup>	755 $\pm$ 89	M <sup>c</sup>	1251 $\pm$ 82	M <sup>d</sup>	1064 $\pm$ 101	M <sup>e</sup>	640 $\pm$ 49
<i>B. intermedia</i>	0 <sup>a</sup>	893 $\pm$ 79	0 <sup>a</sup>	317 $\pm$ 55	0 <sup>a</sup>	94 $\pm$ 12	0 <sup>a</sup>	19 $\pm$ 7
	0,010 + M <sup>b</sup>	677 $\pm$ 67* (24)	0,007 + M <sup>c</sup>	1593 $\pm$ 71 (5)	0,010 + M <sup>d</sup>	981 $\pm$ 61(8)	0,010 + M <sup>e</sup>	338 $\pm$ 37** (47)
	0,030 + M <sup>b</sup>	679 $\pm$ 61* (24)	0,010 + M <sup>c</sup>	1584 $\pm$ 45 (5)	0,030 + M <sup>d</sup>	993 $\pm$ 32(7)	0,030 + M <sup>e</sup>	385 $\pm$ 48** (40)
	0,060 + M <sup>b</sup>	665 $\pm$ 82* (26)	0,030 + M <sup>c</sup>	1504 $\pm$ 68 (10)	0,060 + M <sup>d</sup>	958 $\pm$ 20 (10)	0,060 + M <sup>e</sup>	293 $\pm$ 27*** (54)
	0,120 + M <sup>b</sup>	632 $\pm$ 54** (29)	0,060 + M <sup>c</sup>	1443 $\pm$ 82 (14)	0,120 + M <sup>d</sup>	864 $\pm$ 39** (19)	0,120 + M <sup>e</sup>	253 $\pm$ 19*** (60)
	0,250 + M <sup>b</sup>	621 $\pm$ 42** (30)	0,120 + M <sup>c</sup>	1409 $\pm$ 72 (16)	0,250 + M <sup>d</sup>	725 $\pm$ 23*** (32)	0,250 + M <sup>e</sup>	148 $\pm$ 23*** (77)
	M <sup>b</sup>	53 $\pm$ 12	M <sup>c</sup>	1672 $\pm$ 102	M <sup>d</sup>	1064 $\pm$ 101	M <sup>e</sup>	640 $\pm$ 49

<sup>a</sup> Negative Control: DMSO, 100  $\mu$ L/plate; Mutagens (M): <sup>b</sup>NPD, 10  $\mu$ g/plate; <sup>c</sup>MMC, 0.5  $\mu$ g/plate; <sup>d</sup>AFB<sub>1</sub>, 0.5  $\mu$ g/plate; <sup>e</sup>B[a]P, 1  $\mu$ g/plate. \* p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.0001 (ANOVA)

## References

- Abdillahi, H. S.; Verschaeve, L.; Finnie, J. F.; Van Staden, J., 2012. Mutagenicity, antimutagenicity and cytotoxicity evaluation of South African *Podocarpus* species. *J Ethnopharmacol.* 139, 728-738.
- Arriaga-Alba, M.; Blasco, J L.; Ruiz-Perez, N. J.; Sánchez-Navarrete, J.; Rivera-Sanchez, R.; Gonzalez-Avilla, M., 2011. Antimutagenicity mechanisms of the *Rhoeo discolor* ethanolic extract. *Exp Toxicol Pathol.* 63, 243-248.
- Arriaga-Alba, M.; Ruiz-Pérez, N. J.; Sánchez-Navarrete, J.; De Angel, B. L.; Flores-Lozada, J.; Blasco, J. L., 2013. Antimutagenic evaluation of vitamins B1, B6 and B12 *in vitro* and *in vivo*, with the Ames test. *Food Chem Toxicol.* 53, 228-234.
- Baumeister, P.; Reiter, M.; Harréus, U., 2012. Curcumin and Other Polyphenolic Compounds in Head and Neck Cancer Chemoprevention. *Oxid Med Cell Longev.* Epub.
- Bernstein, L.; Kaldor, J.; Mccann, J.; Pike, M. C., 1982. An empirical approach to the statistical analysis of mutagenesis data from the Salmonella test. *Mutat Res.* 97, 267–281.
- Cardoso, C. R. P.; Cólus, I. M. S.; Bernardi, C. C.; Sannomiya, M.; Vilegas, W.; Varanda, E. A., 2006. Mutagenic activity promoted by amentoflavone and methanolic extract of *Byrsonima crassa* Niedenzu. *Toxicology*, 225, 55- 63.
- De Flora, S., 1998. Mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. *Mutat Res.* 402, 151-158.
- De Pasquale, A., 1984 Pharmacognosy: The oldest modern science. *J. Ethnopharmacol.* 11, 1-16.
- Guilhon-Simplicio, F.; Pinheiro, C. C. S.; Contado, G. G.; Barbosa, G. S.; Dos Santos, P. A.; Pereira, M. M., 2012. Anti-inflammatory, anti-hyperalgesic, antiplatelet and antiulcer activities of *Byrsonima japurensis* A. Juss. (Malpighiaceae). *J Ethnopharmacol.* 140, 282-286.
- Guo, J-J.; Pan, W.; Chen, M-W.; Wang, C-M.; Wang, Y-T., 2013. Overview of Taiwan's Indigenous Ethnopharmacology in the Perspective of Traditional Knowledge Protection. *Chin J Integr Med.* Epub ahead of print.
- Lima, Z. P.; dos Santos, R. C.; Torres, T. U.; Sannomiya, M.; Rodrigues, C. M.; dos Santos, L. C.; Pellizzon, C. H.; Rocha, L. R. M.; Vilegas, W.; Brito, A. R. M. S.; Cardoso, C. R. P. C.; Varanda, E. A.; de Moraes, H. P.; Bauab, T. M.; Carli, C.; Carlos, I. Z.; Hiruma-Lima, C. A., 2008.. *Byrsonima fagifolia*: an integrative study to validate the gastroprotective healing, antidiarrheal, antimicrobial and mutagenic action. *J Ethnopharmacol.* 120, 149-160.
- Lira, W. M.; Dos Santos, F. V.; Sannomiya, M.; Rodrigues, C. M.; Vilegas, W.; Varanda, E. A., 2008. Modulatory effect of *Byrsonima basiloba* extracts on the mutagenicity of certain direct and indirect-acting mutagens in *Salmonella typhimurium* assays. **J Med Food.** 11, 111-119.
- Maron, D. M.; Ames, B. N., 1983. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat Res.* 113, 173-215..
- Mendanha, D. M.; Ferreira, H. D.; Felício, L. P.; Silva, E. M.; Pereira, D. G.; Nunes, W. B.; Carvalho, S., 2010 Modulatory effect of *Byrsonima verbascifolia* (Malpighiaceae) against damage induced by doxorubicin in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Genet Mol Res.* 9, 69 -77.
- Morse, M. A.; Stoner, G. D., 1993. Cancer chemoprevention: principles and prospects. *Carcinogenesis.* 14, 1737-1746.

- Mortelmans, K.; Zeiger, E., 2000. The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. *Mutat Res.* 455, 29 – 60.
- Namasivayam, N., 2011. Chemoprevention in experimental animal. *Ann N Y Acad Sci.* 1215, 60-71.
- Neigi, P. S.; Jayaprakasha, G. K.; Jena, B. S., 2003. Antioxidant and antimutagenic activities of pomegranate peel extracts. *Food Chem.* 80, 393 – 397.
- Rates, S.M.K., 2001. Plants as source of drugs. *Toxicol.* 39, 603-613.
- Resende, F. A.; Barbosa, L. C.; Tavares, D. C.; De Camargo, M. S.; Rezende, K. C. S.; Silva, M. L. A.; Varanda, E. A., 2012a. Mutagenicity and antimutagenicity of (-)-hinokinin a trypanosomicidal compound measured by *Salmonella* microsome and comet assays. *BMC Complement Altern Med.*, 12, 1-10.
- Resende, F. A.; Vilegas, W.; dos Santos, L. C.; Varanda, E. A., 2012b. Mutagenicity of Flavonoids Assayed by Bacterial Reverse Mutation (Ames) Test. *Molecules.* 17, 5255-5268.
- Rinaldo, D.; Batista Jr, J. M.; Rodrigues, J.; Benfatti, A. C.; Rodrigues, C. M.; Dos Santos, L. C.; Furlan, M.; Vilegas, W., 2010. Determination of Catechin Diastereomers from the Leaves of *Byrsonima* species Using Chiral HPLC-PAD-CD. *Chirality.* 22, 726-733.
- Sannomiya, M.; Cardoso, C. R. P.; Figueiredo, M. E.; Rodrigues, C. M.; Dos Santos, L. C.; Dos Santos, F. V.; Serpeloni, J. M.; Cólus, I. M. S.; Vilegas, W.; Varanda, E. A., 2007. Mutagenic evaluation and chemical investigation of *Byrsonima intermedia* A. Juss. leaf extracts. *J Ethnopharmacol.* 112, 319 -326.
- Sannomiya, M.; Rodrigues, C. M.; Coelho, R. G.; Dos Santos, L. C.; Hiruma-Lima, C. A.; Brito, A. R. M. S.; Vilegas, W., 2004. Application of preparative high-speed counter-current chromatography for the separation of flavonoids from the leaves of *Byrsonima crassa* Niedenzu (IK). *J Chromatogr A.* 1035, 47-51.
- Tachino, N.; Guo, D.; Dashwood, W. M.; Yamane, SH.; Larsen, R.; Dashwood, R., 1994. Mechanisms of the in vitro antimutagenic action of chlorophyllin against benzo[a]pyrene: Studies of enzyme inhibition, molecular complex formation and degradation of the ultimate carcinogen. *Mutat Res.* 308, 191-203.
- Tangjitman, K.; Wongsawad, C.; Winijchaiyanan, P.; Sukkho, T.; Kamwong, K.; Pongamornkul, W.; Trisonthi, C., 2013. Traditional knowledge on medicinal plant of the Karen in northern Thailand: A comparative study. *J Ethnopharmacol.* 150, 232 – 243.
- Vargas, V. M. F.; Motta, V. E.P.; Henriques, J. A. P., 1993. Mutagenic activity detected by the Ames test in river water under the influence of petrochemical industries. *Mutat Res.* 319, 31-45.
- Xu, G.; Ren, G.; Xu, X.; Yuan, H.; Wang, Z.; Kang L.; Yu, W.; Tian, K., 2010. Combination of curcumin and green tea catechins prevents dimethylhydrazine-induced colon carcinogenesis. *Food Chem Toxicol.* 48, 390-395.
- Zeiger, E., 2001. Mutagens that are not carcinogens: faulty theory or faulty tests? *Mutat Res.* 492, 29-38.

RESEARCH ARTICLE

Open Access

# Estrogenic and mutagenic activities of *Crotalaria pallida* measured by recombinant yeast assay and Ames test

Paula Karina Boldrin<sup>1</sup>, Flávia Aparecida Resende<sup>1\*</sup>, Ana Paula Oliveira Höhne<sup>1</sup>, Mariana Santoro de Camargo<sup>1</sup>, Lívia Gregghi Espanha<sup>1</sup>, Catarine Haidê Nogueira<sup>1</sup>, Maria do Socorro F Melo<sup>2</sup>, Wagner Vilegas<sup>2</sup> and Eliana Aparecida Varanda<sup>1</sup>

## Abstract

**Background:** *Crotalaria pallida* Ailton is a plant belonging to the Fabaceae family, popularly known as “rattle or rattlesnake” and used in traditional medicine to treat swelling of the joints and as a vermifuge. Previous pharmacological studies have also reported anti-inflammatory, antimicrobial and antifungal activities. Nevertheless, scientific information regarding this species is scarce, and there are no reports related to its possible estrogenic and mutagenic effects. Thus, the purpose of the present study was to investigate the estrogenic potential of *C. pallida* leaves by means of the Recombinant Yeast Assay (RYA), seeking an alternative for estrogen replacement therapy during menopause; and to reflect on the safe use of natural products to assess the mutagenic activity of the crude extract from *C. pallida* leaves, the dichloromethane fraction and stigmasterol by means of the Ames test.

**Methods:** The recombinant yeast assay with the strain BY4741 of *Saccharomyces cerevisiae*, was performed with the ethanolic extract, dichloromethane fraction and stigmasterol isolated from the leaves of *C. pallida*. Mutagenic activity was evaluated by the *Salmonella*/microsome assay (Ames test), using the *Salmonella typhimurium* tester strains TA100, TA98, TA97 and TA102, with (+S9) and without (–S9) metabolization, by the preincubation method.

**Results:** All samples showed estrogenic activity, mainly stigmasterol. The ethanolic extract from *C. pallida* leaves showed mutagenic activity in the TA98 strain (–S9), whereas dichloromethane fraction and stigmasterol were found devoid of activity.

**Conclusion:** Considering the excellent estrogenic activity performed by stigmasterol in the RYA associated with the absence of mutagenic activity when evaluated by the Ames test, stigmasterol becomes a strong candidate to be used in hormone replacement therapy during menopause.

**Keywords:** *Crotalaria pallida*, Mutagenicity, Ames test, Estrogenicity, Recombinant yeast assay (RYA)

## Background

Medicinal plants have been traditionally used worldwide for the treatment of various human diseases. They have proved to be abundant sources of biologically active compounds, many of which have been used as lead compounds to develop new pharmaceuticals [1].

*Crotalaria pallida* Ailton is a species that belongs to the Fabaceae family, popularly known as “rattle or rattlesnake” due to the sound of their fruits when dry [2]. This species is used in traditional medicine, having its roots used to treat swelling of the joints, and its leaves as vermifuge [3]. Pharmacological studies have demonstrated it also presents anti-inflammatory, antimicrobial and antifungal functions [4-8]. However, there are no studies verifying the estrogenic potential of *C. pallida*.

One of the current interests, in the pharmacological area, is to find compounds with estrogenic activity to replace estrogen in hormone replacement therapy (HRT)

\* Correspondence: flaviabiomed@yahoo.com.br

<sup>1</sup>Department of Biological Sciences, Faculty of Pharmaceutical Sciences of Araraquara, UNESP- São Paulo State University, Rodovia Araraquara-Jaú, Km 1, 14801-902 Araraquara, São Paulo, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article



during menopause, without the undesirable effects of estrogen, such as the elevation of breast cancer incidence [9,10]. For this reason, the development of safer and more effective drugs for menopause treatment is an urgent priority. Plants appear as a therapeutic option, since some of their constituents have the ability to bind to estrogen receptors and to act in preventing the discomfort caused by the hormonal imbalance associated with menopause. These constituents are also related to the reduction of cancer incidence, particularly estrogen-dependent cancers, such as breast cancer, cardiovascular diseases and osteoporosis [11-14].

Seeking to find options for drug development, the estrogenic potential of *C. pallida* leaves was investigated using the RYA (Recombinant Yeast Assay), in which recombinant yeast is utilized as an experimental model and the transcription of a reporter gene depends on the presence in the midst of compounds capable of binding to the estrogen receptor [15].

In the light of finding a good candidate for HRT and given that natural products are promising sources of novel potentially therapeutic agents, another purpose of the present study was to investigate the mutagenic activities of *C. pallida* by the Ames test, in order to contribute to a toxicological evaluation of the candidate samples to be employed in HRT.

## Methods

### Chemicals

Dimethylsulfoxide (DMSO), nicotinamide adenine dinucleotide phosphate sodium salt (NADP), D-glucose-6-phosphate disodium salt, magnesium chloride, L-histidine monohydrate, D-biotin, sodium azide (SAZ), 2-anthramine (2-AA), 4-nitro-*o*-phenylenediamine (NOPD), mitomycin C (MMC), 2-aminofluorene (2-AF), 17- $\beta$ -estradiol, Triton X-100, SDS 10%, 2-mercaptoethanol and 4-methylumbelliferyl  $\beta$ -D-galactoside were purchased from Sigma Chemical Co (St. Louis, USA). Oxoid Nutrient Broth No. 2 (Oxoid, England) and Difco Bacto Agar (Difco, USA) were used as bacterial media.

### Plant material

Leaves of *C. pallida* Aiton were collected in Poços de Caldas, Minas Gerais state, Brazil, and authenticated by Prof. Dr. Luis Victor Silva Sacramento. The voucher of *C. pallida* (BOTU 28656) was deposited at the Herbarium of the Botanical Institute of São Paulo State University (UNESP), Botucatu, São Paulo.

### Extraction and isolation

The leaves collected were dried in an oven with air circulation at 40°C. The samples were weighed for three days daily until constant weight. The material was pulverized and then moistened with 70% ethanol. This material was

then accommodated in percolator and submitted to leaching process with 70% ethanol. The extracts were monitored using TLC-silica gel 60-F<sub>254</sub> precoated Al sheets, using chloroform: methanol: *n*-propanol:water (5:6:1:4, v:v) as developing solvent, visualized using UV (254 and 366 nm) and anisaldehyde sulphuric acid spray [16], until total depletion of the drug. Following, the extract was filtered with pleated filter paper and concentrated under reduced pressure (40°C). After lyophilization, the 70% hydroalcoholic extract was obtained. The chromatographic determination of the EtOH 70% extract was performed by HPLC-DAD (HPLC-PDA, Jasco °, Column Phenomenex Synergi Hydro ° RP-18 250 × 4.6 mm id; 4 mm, 1.0 ml min<sup>-1</sup>, FM: A = H<sub>2</sub>O with 0.1% formic acid, B = acetonitrile, linear gradient 0-100% B 60 minutes). The chromatographic profile obtained from the extract of the leaves was assessed in a chromatographic comparison of the signals observed. Their absorption spectra (220–400 nm) allowed us to observe the presence of flavonoids, mainly derivatives of apigenin and luteolin (flavones) ( $\lambda = 254$  nm) and phenolic acids and derivatives ( $\lambda = 254$  nm) [17].

In order to obtain the dichloromethane fraction by partition, chromatography was performed (liquid-liquid extraction - LLE) with dichloromethane (DCM) and methanol:water (2:8 v/v) (3x), yielding two fractions with different polarities: a dichloromethane fraction (DCM-Fr) and an aqueous fraction (Aq-Fr). Each of the fractions obtained from the LLE rotary evaporator were dried in order to remove the solvent and then frozen so as to have their mass determined. The fractions obtained from the LLE were subjected to a new fractioning using two techniques: the first dichloromethane fraction (DCM-Fr) was submitted to chromatography using an open silica gel column as the stationary phase and hexane mobile phase. The second technique was applied to the Aq-Fr in Medium Pressure Liquid Chromatography (MPLC) column using packed with C<sub>18</sub> in the reverse silica and methanol:water solvent systems. The fractions obtained in the procedure above were analyzed by HPLC-PDA in order to obtain a preliminary view of the substances. Comparing the chromatograms obtained from the MPLC fractions, the majority of the substances absorbing UV belong to the class of flavones.

Chromatography by MPLC did not result in the separation of the pure substance, making a further step of purification necessary, using a preparative HPLC-PDA in order to isolate the majority of substances. The chromatographic analysis of the dichloromethane fraction allowed us to infer that the Fr 23–33 fraction was practically pure. The isolated substance was called F2. The 1H NMR spectrum showed characteristic signals of hydrogen steroid [18]. A comparison of the NMR chemical shifts of 1 H NMR substance alone, with the

records in the literature [18] allowed us to identify it as stigmaterol.

#### Recombinant yeast assay (RYA)

RYA was performed essentially as in Garcia-Reyero et al. [15]. Briefly, the yeast strain BY4741 (MATa *ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 met15Δ0*) (EUROSCARF, Frankfurt, Germany), which was kindly provided by Dr. Benjamin Piña (CSIC, Barcelona, Spain), was transformed together with plasmids pH5HE0 and pVitBX2 [15].

The expression plasmid pH5HE0 contained the human estrogen hormone receptor gene HE0 [19], cloned into the constitutive yeast expression vector pAAH5 [20]. The reporter plasmid pVITB2x contained two copies of the pseudo-palindromic responsive estrogen element from the *Xenopus laevis* vitellogenin B1 gene (5'-AGTCACT GTGACC-3'), inserted into the unique KpnI site of pSFLΔ-178 K [21].

Transformed clones were first grown in 3 mL of rich complete medium at 30°C. Following, they were grown overnight in a minimal medium. The final culture was adjusted to an optical density (OD) of 0.1 at 600 nm and distributed in the wells of a siliconized 96-well polypropylene microliter plate (NUNC™, U96 PP 0.5 mL), at 90 μL in the first row. Aliquots of 10 μL of the crude extract, dichloromethane fraction and stigmaterol at initial concentrations of 0.01, 0.03 and 0.15 × 10<sup>-6</sup> g/mL, respectively, were dispensed into wells in the first row and serial dilutions were prepared along the plate, containing the samples with dilution factors of 1:10, 1:30, 1:90, 1:270 and 1:810. All the used concentrations are determinate in previous experiments of toxicity.

A positive control was made by adding 17-β-estradiol at a final concentration of 10 nM. Moreover, we included a toxicity control by adding 10 nM of 17-β-estradiol to a sample with a dilution factor of 1:30, and 10% DMSO as negative control.

Plates were incubated for 6 h at 30°C under 120 rpm. After incubation, 50 μL of Y-PERTM (PIERCE™, Rockford, IL, USA) were added to each well and incubated at 30°C for further 30 min. Afterwards, 50 μL of assay buffer were added to the lysed cells. The assay buffer was prepared by mixing 100 mL Z-buffer, 1 mL Triton X-100 (Sigma), 1 mL SDS 10%, 70 μL 2-mercaptoethanol (Fluka) and 21 mg of 4-methylumbelliferyl β-D-galactoside (Sigma). The Z-Buffer is a combination of: 60 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 40 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM KCl and 1 mM MgSO<sub>4</sub>, pH 7.0.

After centrifugation, plates were read in a spectrofluorometer (Synergy H1, Biotek), at 355 nm excitation and 460 nm emission wavelengths. Fluorescence was recorded for 20 min (one measurement per min); β-galactosidase activity was calculated as the rate of increase of fluorescence (in arbitrary units). RYA does not provide a direct

measurement of the molar (or mass) concentration of endocrine disruptors, but of their estrogenic activity. For simplification, results were calculated as estradiol equivalents (EEQ), defined as the amount of estradiol that should be present to account for the observed response in a given sample. These equivalents were calculated from the lowest dilution in which the β-galactosidase activity was indistinguishable from that of the control (only vehicle).

To translate results from serial dilutions to EEQ, we assumed that hormonal dose–response curves follow a sigmoidal function,

$$\frac{R-R_0}{R_{\max}-R_0} = \frac{1}{1 + \frac{K_d}{[L]}}$$

In which R<sub>0</sub>, R, and R<sub>max</sub> represent β-galactosidase units obtained without ligand (or extract) addition, at a given ligand concentration [L], and at a saturating ligand concentration, respectively. K<sub>d</sub> represents the dissociation constant of the ligand–hormone complex; its value coincides with EC<sub>50</sub>, the ligand concentration giving 50% of the maximal response. For extract serial dilutions, plotting dilution factors versus relative response followed an inverse sigmoidal function, in which the apparent EC<sub>50</sub> correspond to the dilution (actual or theoretical) giving 50% the response for 10 nM estradiol. Apparent EC<sub>50</sub> values for each sample (a minimum of two replicas with at least four points each) were calculated using standard non-linear regression methods. These values were converted to EEQ by assuming they correspond to the EC<sub>50</sub> of estradiol [22], 7.29 × 10<sup>-9</sup> g/mL in our assay. Three independent experiments were done with the compounds, all of them in triplicate.

#### Salmonella/microsome assay

Mutagenic activity was evaluated by the *Salmonella*/microsome assay, using the *Salmonella typhimurium* tester strains TA98, TA100, TA97a and TA102, which were kindly provided by Dr. B.N. Ames (Berkeley, CA, USA), with (+S9) and without (–S9) metabolization, using the preincubation method [23]. The strains were grown overnight from frozen cultures for 12–14 h in Oxoid Nutrient Broth No. 2. The metabolic activation mixture (S9 fraction), prepared from livers of Sprague–Dawley rats treated with the polychlorinated biphenyl mixture Aroclor 1254 (500 mg/kg), was purchased from Molecular Toxicology Inc. (Boone, NC, USA) and freshly prepared before each test. The metabolic activation system consisted of 4% S9 fraction, 1% 0.4 M MgCl<sub>2</sub>, 1% 1.65 M KCl, 0.5% 1 M D-glucose-6-phosphate disodium and 4% 0.1 M NADP, 50% 0.2 M phosphate buffer and 39.5% sterile distilled water [23]. For the determination of the mutagenic activity, five different concentrations of each sample

**Table 1 Estrogenic activity expressed through the values of estradiol equivalents (EEQ) ± standard deviation of the extracts and EC<sub>50</sub> values of the ethanol extract of *C. pallida*, dichloromethane fraction and stigmasterol using a genetically modified strain of *S. cerevisiae* BY4741**

Samples	EEQ (nM) M ± SD	EC <sub>50</sub> (g/mL)
Ethanolic extract	14.3 ± 4.1	0.2
Dichloromethane fraction	89.0 ± 16.0	0.1
Stigmasterol	122.0 ± 11	10.5 × 10 <sup>-7</sup>
17-β-estradiol	-	7.29 × 10 <sup>-9</sup>

EEQ, Values of estradiol equivalents (EEQ); M ± SD, Mean and standard deviation; EC<sub>50</sub>, Concentration of sample equivalent to 50% of the activity.

(0.7 to 18.9 mg/plate for extract, 0.3 to 3.4 mg/plate for dichloromethane fraction and 0.02 to 0.5 mg/plate for stigmasterol), diluted in DMSO, were assayed. The mutagenic activity of the dichloromethane fraction and of the stigmasterol was only evaluated in the TA98 strain, because of the small amount of material available for the study and based in the fact that initially mutagenic activity was only observed for TA98. The concentrations of the samples were selected based on a preliminary toxicity test. In all subsequent assays, the upper limit of the dose range tested was either the highest non-toxic dose or the lowest toxic dose determined in this preliminary assay. Toxicity was detected either as a reduction in the number of histidine revertants (His+), or as a thinning of the auxotrophic background (*i.e.*, background lawn).

The various concentrations of extract, fraction and isolated substance to be tested were added to 0.5 mL of 0.2 M phosphate buffer or to 0.5 mL of 4% S9 mixture, with 0.1 mL of bacterial culture and then incubated at 37°C for 20–30 min. Following, 2 mL of top agar were

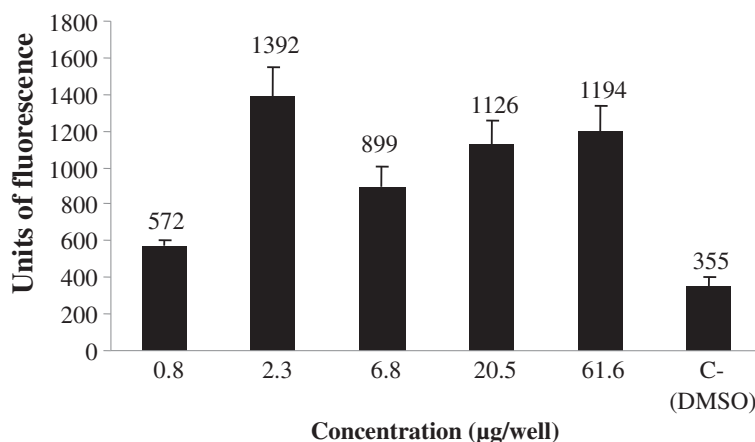
added and the mixture poured on to a plate containing minimal agar.

The plates were incubated at 37°C for 48 h and the His+ revertant colonies were counted manually. All experiments were analyzed in triplicate. The results were analyzed with the statistical software package Salanal 1.0 (U.S. Environmental Protection Agency, Monitoring Systems Laboratory, Las Vegas, NV, from the Research Triangle Institute, RTP, NC, USA), adopting the model of Bernstein et al. [24]. The data (revertants/plate) were assessed by means of the analysis of variance (ANOVA), followed by linear regression. The mutagenicity ratio (MR) was also calculated for each concentration tested, this being the mean number of revertants per plate with the test compound divided by the mean number of revertants per plate with the negative (solvent) control. A test solution was considered mutagenic when a dose–response relationship was detected and a two-fold increase in the number of mutants (MR ≥ 2) was observed in at least one concentration [1]. The standard mutagens used as positive controls in experiments without the S9 mix were NOPD (10 µg/plate) for TA98 and TA97a, SAZ (1.25 µg/plate) for TA100 and MMC (0.5 µg/plate) for TA102. In experiments with S9 activation, 2-AA (1.25 µg/plate) was used with TA98, TA97a and TA100 and 2-AF (10 µg/plate) with TA102. DMSO served as negative (solvent) control.

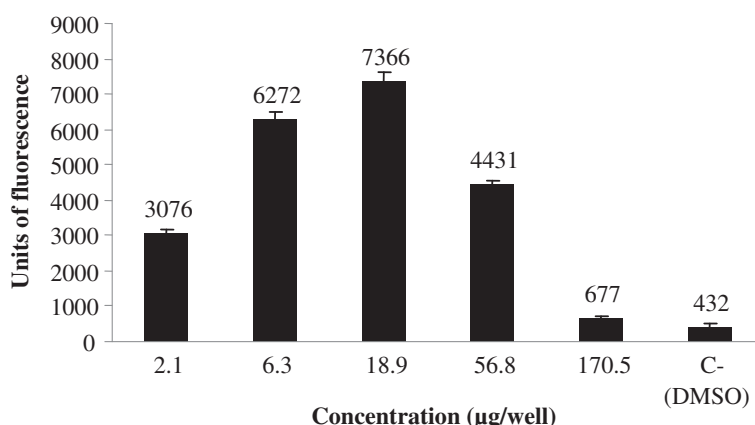
## Results

### Estrogenicity assay (RYA)

The result of the estrogenic activity assessment, performed using the RYA, was given as equivalent to estradiol (EEQ) and EC<sub>50</sub> (Table 1). The extract from *C. pallida* leaves obtained an EEQ of 14.3 nM in the RYA, whereas the fraction obtained 89.0 nM. The isolated substance



**Figure 1 Estrogenic response for extract of *C. pallida* leaves in the recombinant yeast assay.** Different concentrations of extract of *C. pallida* leaves (µg/well) were added to genetically engineered, estrogen- responsive yeast cells and incubated for 6 h. The β-galactosidase activities were calculated as fluorescence units (FU). Values are averages of three independent experiments; bars indicate value ranges. Negative control, DMSO, FU = 355 ± 21; positive control, 17-β-estradiol, FU = 9834 ± 985.



**Figure 2 Estrogenic response for extract dichloromethane fraction of *C. pallida*, in the recombinant yeast assay.** Different concentrations of dichloromethane fraction of *C. pallida*, (µg/well) were added to genetically engineered, estrogen- responsive yeast cells and incubated for 6 h. The β-galactosidase activities were calculated as fluorescence units (FU). Values are averages of three independent experiments; bars indicate value ranges. Negative control, DMSO, FU = 432 ± 34; positive control, 17-β-estradiol, FU = 11490 ± 496.

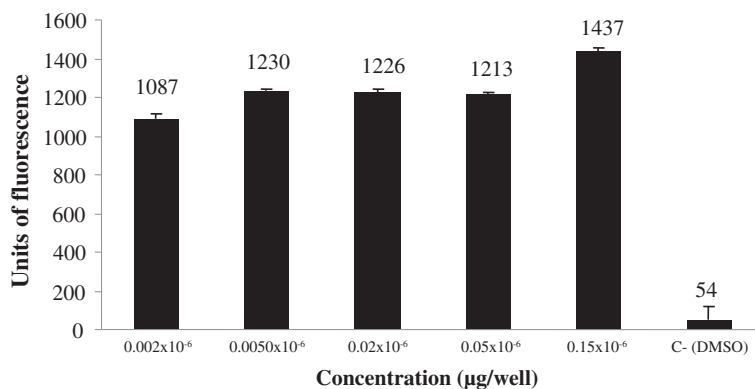
obtained the highest value equivalent to estradiol, 122 nM. Regarding the EC<sub>50</sub> values, stigmasterol proved to be the most potent sample, with EC<sub>50</sub> values of 10.5 × 10<sup>-7</sup> g/mL.

Figure 1 shows the estrogenic activity, assessed by the β-galactosidase activity expressed in arbitrary units of fluorescence of five concentrations of the extract. It is possible to observe that the different concentrations tested presented significant enzymatic activation when compared to the negative control and the estrogenic activity of the extract starting from the second lowest concentration. The dichloromethane fraction (Figure 2) also generated an increase of fluorescence units, even at lower concentration that is similar to the second lowest concentration of the extract. The concentration of 18.9 µg/well provided the greatest estrogenic activity for this sample. Figure 3 shows the estrogenic activity, expressed in fluorescence units, for stigmasterol isolated from *C. pallida* leaves. The average

fluorescence was compared to negative control. This sample generated a significant activation of the β-galactosidase enzyme, at all concentrations tested, and the units of fluorescence were greater than those found in the negative control.

#### Mutagenicity assay (Ames test)

Table 2 shows the mean number of revertants/plate, the standard deviation (SD) and the MR after treatment with the five concentrations of crude extract, observed in *S. typhimurium* strains TA98, TA100, TA97a and TA102, in the presence (+S9) and absence (-S9) of metabolic activation. The mutagenic activity was considered negative for the strains TA97, TA102 and TA100 at all concentrations tested, both in the absence and in the presence of metabolism. However, in the absence of the external metabolizing system (-S9), the crude extract was mutagenic,



**Figure 3 Estrogenic response for stigmasterol, isolated from *C. pallida* leaves, in the recombinant yeast assay.** Different concentrations of stigmasterol, (µg/well) were added to genetically engineered, estrogen- responsive yeast cells and incubated for 6 h. The β-galactosidase activities were calculated as fluorescence units (FU). Values are averages of three independent experiments; bars indicate value ranges. Negative control, DMSO, FU = 54 ± 16; positive control, 17-β-estradiol, FU = 9678 ± 167.

**Table 2 Mutagenic activity expressed by the mean number of revertants/plate ± standard deviation and mutagenicity ratio (in brackets) of the ethanol extract of *C. pallida* leaves in *S. typhimurium* strains in the absence (-S9) and in the presence of metabolism (+S9)**

Extract from <i>Crotalaria pallida</i> leaves										
Treatment mg/plate	TA97a		TA102		Treatment mg/plate	TA100		Treatment mg/plate	TA98	
	-S9	+S9	-S9	+S9		-S9	+S9		-S9	+S9
DMSO	108 ± 4	140 ± 21	170 ± 6	196 ± 10	DMSO	110 ± 0,6	185 ± 6	DMSO	43 ± 2	20 ± 4
0.7	129 ± 14 (1.2)	177 ± 12 (1.3)	150 ± 24 (0.9)	224 ± 6 (1.1)	0.9	122 ± 2 (1.1)	237 ± 13 (1.3)	1.8	51 ± 0 (1.2)	18 ± 2 (0.9)
1.9	119 ± 4 (1.1)	164 ± 2 (1.2)	143 ± 5 (0.8)	251 ± 5 (1.3)	2.3	106 ± 7 (1.0)	295 ± 51 (1.1)	4.5	65 ± 8 (1.5)	18 ± 1 (0.9)
3.7	109 ± 5 (1.0)	141 ± 5 (1.0)	146 ± 6 (0.9)	275 ± 19 (1.4)	4.5	145 ± 5 (1.3)	203 ± 3 (1.1)	9.0	95 ± 13* (2.2)	17 ± 2 (0.9)
5.6	97 ± 3 (0.9)	134 ± 12 (1.0)	128 ± 5 (0.8)	265 ± 8 (1.4)	6.8	118 ± 6 (1.1)	222 ± 8 (1.2)	13.5	95 ± 22* (2.2)	21 ± 2 (1.0)
7.4	117 ± 6 (1.1)	174 ± 4 (1.2)	194 ± 5 (1.1)	219 ± 2 (1.1)	9.0	83 ± 5 (0.8)	167 ± 36 (0.9)	18.0	77 ± 12 (1.8)	19 ± 1 (0.9)
Control +	1488 ± 18 <sup>a</sup>	2253 ± 56 <sup>b</sup>	1720 ± 26 <sup>c</sup>	1168 ± 28 <sup>d</sup>	Control +	1312 ± 60 <sup>e</sup>	1195 ± 157 <sup>b</sup>	Control +	1050 ± 39 <sup>a</sup>	1063 ± 24 <sup>b</sup>

\* $p < 0.05$  (ANOVA); Negative Control: dimethyl sulfoxide (DMSO - 100 µL/plate); Positive Control (Control+); <sup>a</sup>4-nitro-*o*-phenylenediamine (10.0 µg/plate); <sup>b</sup>2-anthramine (1.25 µg/plate); <sup>c</sup>mitomycin (0.5 µg/plate); <sup>d</sup>2-aminofluorene (10.0 µg/plate); <sup>e</sup>sodium azide (1.25 µg/plate).



with a mutagenic ratio higher than 2.0 at the concentrations of 9.0 and 13.5 mg/plate in the TA98 strain. Thus, the Ames test was applied to the fraction and to stigmasterol in the same conditions, using the TA98 strain, since the extract showed mutagenic activity for this strain.

As shown in Table 3, no mutagenic activity was observed for the dichloromethane fraction at any of the concentrations examined for TA98 strain. Stigmasterol was not found mutagenic for the TA98 strain in the presence and absence of metabolizing enzymes either. As shown in Table 4, no MR greater than 2 was observed.

### Discussion

RYA was used to identify compounds with structurally similar estrogenic activity to the natural estrogen, 17- $\beta$ -estradiol, and which can interact with the ER. This test utilizes an engineered yeast strain that harbors two foreign genetic elements: a vertebrate receptor, in this case, a human estrogen receptor (ER), and a reporter gene, whose expression is made dependent on the presence of estrogens and whose final product concentration is easy to measure [25].

The samples showed significant estrogenic activity when evaluated by RYA. The crude extract of *C. pallida* leaves showed an equivalent value to estradiol of 14.5 nM, which evidences that this extract has compounds with affinity for the ER present in yeast. The extract promoted a significant activation of the  $\beta$ -galactosidase enzyme, which could be observed due to the high fluorescence units. The same could be observed with the dichloromethane fraction, which presented an equivalent value to estradiol of 89.0 nM and promoted a high value of fluorescence units. Since the dichloromethane fraction of leaves from this plant stood out due to their estrogenic potential, there was

**Table 3 Mutagenic activity expressed by the mean number of revertants/plate  $\pm$  standard deviation and mutagenicity ratio (in brackets) of dichloromethane fraction of *C. pallida* in *S. typhimurium* strain (TA98) in the absence (-S9) and in the presence of metabolism (+S9)**

Treatment mg/plate	Dichloromethane fraction of <i>C. pallida</i> TA98	
	-S9	+S9
DMSO	14 $\pm$ 3	27 $\pm$ 3
0.3	19 $\pm$ 2 (1.4)	29 $\pm$ 6 (1.1)
0.9	15 $\pm$ 2 (1.1)	27 $\pm$ 2 (1.0)
1.7	15 $\pm$ 2 (1.1)	29 $\pm$ 5 (1.1)
2.6	17 $\pm$ 3 (1.2)	33 $\pm$ 4 (1.2)
3.4	19 $\pm$ 4 (1.4)	31 $\pm$ 2 (1.1)
Control+	751 $\pm$ 96 <sup>a</sup>	1088 $\pm$ 109 <sup>b</sup>

Negative Control: dimethyl sulfoxide (DMSO - 100  $\mu$ L/plate); Positive Control (Control+); <sup>a</sup>4-nitro-*o*-phenylenediamine (10.0  $\mu$ g/plate); <sup>b</sup>2-anthramine (1.25  $\mu$ g/plate).

**Table 4 Mutagenic activity expressed by the mean number of revertants/plate  $\pm$  standard deviation and mutagenicity ratio (in brackets) of stigmasterol, isolated substance of dichloromethane fraction of *C. pallida* leaves in *S. typhimurium* strain (TA98) in the absence (-S9) and in the presence of metabolism (+S9)**

Treatment mg/plate	Stigmasterol 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)
Control +	815 $\pm$ 21 <sup>a</sup>	1531 $\pm$ 36 <sup>b</sup>

Negative Control: dimethyl sulfoxide (DMSO - 100  $\mu$ L/plate); Positive Control (Control+); <sup>a</sup>4-nitro-*o*-phenylenediamine (10.0  $\mu$ g/plate); <sup>b</sup>2-anthramine (1.25  $\mu$ g/plate).

a great interest in discovering the substance responsible for the activity that was so evident in the leaves.

The chromatographic profile of the leaves revealed the presence of flavones, for instance apigenin and luteolin derivatives. Flavonoids have some structural similarities to the natural estrogen 17- $\beta$ -estradiol, as well as to other steroid hormones and steroid hormone antagonists [26], and can interact with the ER and induce gene expression similar to that induced by estrogens, albeit at a lower affinity [27].

Regarding the structure of flavonoids and their possible estrogenic activity, Zand et al. [26] reported that hydroxyl at the 6, 7 or 4' positions of the flavonoid provides greater estrogenic activity and more potent compounds with 2-4 hydroxyl groups, namely, at least one in the 7 position of the ring A and another in the 4' position of ring B. The presence of these hydroxyl groups is essential for the estrogenic activity because they mimic the hydroxyl at the 3 and 17 position, found in the 17- $\beta$ -estradiol molecule [28]. Furthermore, the presence of a double bond between carbons 2 and 3 of the ring C is essential for the estrogenic activity [26]. These structural features are exhibited by the apigenin and luteolin molecules, which allow a good interaction with ER.

However, derivatives of flavonoids, such as apigenin and luteolin, usually appear glycosylated [29], and this glycosylation can eliminate the free hydroxyl that is essential for the interaction with ERs or substituents may provide steric hindrance that also hinders the interaction with ERs. Furthermore, the ortho positioning between two hydroxyl groups may serve to reduce estrogenicity, due to the avoidance of direct interaction with ER [30], as observed with the luteolin molecule. Thus, these flavones were probably

not responsible for the estrogenic activity performed by the extract.

In view of the promising results obtained in experiments with extract of leaves and considering that the extract is a complex mixture of several unknown organic compounds [1], the evaluation of isolated compounds is even more relevant. In this context, stigmasterol was isolated from the dichloromethane fraction of leaves and, following, its estrogenic activity assessed by RYA.

The results for stigmasterol in RYA showed that it is highly likely that this substance is responsible for the high estrogenicity found in leaves of *C. pallida*, since it was able to provide the highest result equivalent to estradiol (122.0 nM) and an important EC<sub>50</sub> value of  $10.5 \times 10^{-7}$  g/mL.

Stigmasterol belongs to the class phytosteroids extracted from species of plants. Among the most common phytosteroids are  $\beta$ -sisterol, campesterol and stigmasterol. Chemically, they are alcohols consisting of 28 or 29 carbon atoms, similar to cholesterol [31].

The advantages of phytosteroids result from its biodegradability, the ability to affect numerous biological processes through membranes, to bind to specific hormone receptors and to be modified by synthetic methods [32-34].

The structural similarity between the molecule and stigmasterol from 17- $\beta$ -estradiol (Figure 4) is remarkable, justifying the high estrogenic activity found in this sample by means of the RYA.

Since one of the purposes of this study was to search for compounds with estrogenic activity that could be used in hormone replacement therapy, the results obtained for the samples, mainly for stigmasterol, in the RYA, make these substances possible candidates.

Regarding the safe use of natural products, the mutagenic activity of the crude extract of *C. pallida* leaves, dichloromethane fraction and stigmasterol were assessed by the Ames test. Although the crude extract of *C. pallida* leaves showed good results when assessed as for its estrogenic activity, it proved to be mutagenic when evaluated by the Ames test. The extract was mutagenic for the TA98 strain, in the absence of metabolic activity. This allows us

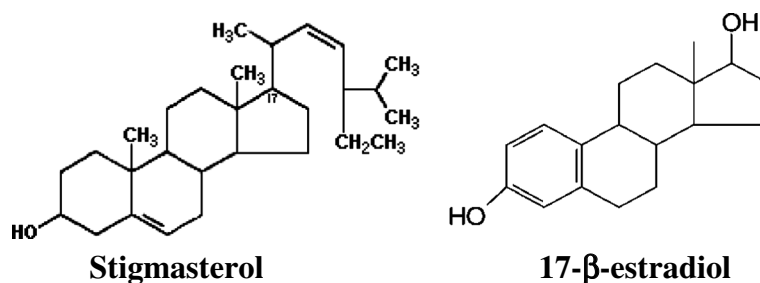
to state that this extract has direct mutagens acting as per the mechanism of *frameshift*.

In relation to the study of the mutagenic potential of flavonoids, Rietjens et al. [35] have described essential features in the flavonoid structure for the mutagenic activity to be present, such as: a free hydroxyl at the 3 position of the ring C, double bond between the 2 and 3 positions and the keto group at the 4 position. These characteristics are fundamental for the presence of mutagenic activity because they allow the hydroxyl at the 3 position to tautomerize molecule for molecule 3-keto. However, the apigenin and luteolin molecules do not have hydroxyl at the 3 position of the ring C, which may suggest that these substances are not responsible for the mutagenic activity found in the extract.

The literature reports that pyrrolizidine alkaloids are often found in *Crotalaria* species, including *C. pallida* [36,37]. Previous studies have demonstrated that alkaloids are able to induce chromosomal aberrations in the CHO (Chinese Hamster Ovary) [38] cell line, mutagenicity in Chinese hamster lung cells (CHL) [39], sister chromatid exchange in human peripheral lymphocytes [40] and increase the frequency of micronuclei and sister chromatid exchange in meristematic cells of *Allium cepa* [41]. The hepatotoxic activity of pyrrolizidine alkaloids probably results from the high reactivity of alkylating pyrrole derivatives, generated during enzymatic metabolism [42]. Both alkaloid molecules and metabolites are reactive alkylating agents capable of forming covalent bonds with stable macromolecules [43,44]. Due to the ability of pyrrolizidine alkaloids to interact with the genetic material, their involvement has been evidenced with mutagenicity and carcinogenesis [43].

In this study, the dichloromethane fraction and stigmasterol did not show mutagenic activity when evaluated by the Ames test in the TA98 strain. Considering the promising estrogenic activity of this isolated substance, a lack of mutagenic effect in bacterial systems is highly relevant.

Phytosterols such as stigmasterol are known as antioxidants [45], playing a role in the chemoprevention of DNA



**Figure 4** Structural similarity between stigmasterol and 17- $\beta$ -estradiol.

damage induced by oxidative radicals [46]. The exact mechanism by which phytosteroids offer protection against cancer is not understood, but there are theories proposing their effect on the structure of cell membranes, on the fluidity of cell membranes, on enzymes bound to membranes, on signal transduction pathways, on apoptosis, on membrane integrity, on the immune function, on the estrogenic properties on the tissue and on acids and neutral steroids in the colon [31].

Lim et al. [47] reported stigmaterol as a substance with high antimutagenic activity in *Gleditsia sinensis* Lam, Leguminosae, obtaining a reduction of 51.2% and 64.2% of mutagenicity against MNNG (N-methyl-N'-nitro-nitrosoguanidine) and 4-NQO (4-nitroquinoline-N-oxide) mutagens, respectively, by means of *in vitro* assay, referring to the application of stigmaterol as an anticancer agent, but emphasizing the need for *in vivo* studies. Substances with antimutagenic potential increase the efficiency of the repair mechanisms of mutations caused by mutagens or cause the inactivation of the mutagenic substance. As a result, these substances act as protective agents, reducing the frequency of DNA damage. In both cases, however, they act before the disordered multiplication of cells or tumor formation [48].

Considering the promising estrogenic activity and that stigmaterol might be successfully incorporated into pharmaceutical products, the absence of a mutagenic effect in the Ames assay is a positive step towards determining its safe use in hormone replacement therapy during menopause.

## Conclusions

In conclusion, this study evidenced that the crude extract of *C. pallida* leaves has an estrogenic effect. Nevertheless, the present results indicate that this extract should be used with caution because it might be mutagenic. Considering that medicinal herbs contain complex mixtures of thousands of components that can act alone or synergistically, the estrogenic activity of dichloromethane fraction and stigmaterol isolated from *C. pallida* leaves with absence of a mutagenic effect in the Ames assay is highly relevant, since these samples may be successfully incorporated into pharmaceutical products with an important role in hormone replacement therapy.

## Abbreviations

NOPD: 4-Nitro-*o*-phenylenediamine; SAZ: Sodium azide; MMC: Mitomycin C; 2-AA: 2-Anthramine; 2-AF: 2-Aminofluorene; DMSO: Dimethylsulfoxide; PBS: Phosphate buffer saline; +S9: With metabolization; -S9: Without metabolization; MR: Mutagenicity ratio.

## Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

## Authors' contributions

PKB designed and performed the experiments, interpreted the results and drafted the manuscript. APSO, MSC and FAR designed and performed the Recombinant Yeast Assay. LGE and CHN participated in the experiments of the Ames test. MSFM and WW prepared the ethanol extract of *C. pallida* and dichloromethane fraction, and isolated the stigmaterol. FAR and EAV critically read the manuscript and participated in its revision. All authors have read and approved the final manuscript.

## Acknowledgements

The development of this study was supported by São Paulo Research Foundation (FAPESP) and the Brazilian Federal Agency for Support and Evaluation of Graduate Education (CAPES).

## Author details

<sup>1</sup>Department of Biological Sciences, Faculty of Pharmaceutical Sciences of Araraquara, UNESP- São Paulo State University, Rodovia Araraquara-Jaú, Km 1, 14801-902 Araraquara, São Paulo, Brazil. <sup>2</sup>Chemical Institute of Araraquara, UNESP-São Paulo State University, c.p. 355, 14800-900 Araraquara, São Paulo, Brazil.

Received: 20 March 2013 Accepted: 2 September 2013

Published: 4 September 2013

## References

1. Resende FA, Munari CC, Bentos MNA, Tavares DC, Bastos JK, da Silva Filho AA, Varanda EA: **Comparative studies of the (anti) mutagenicity of *Baccharis dracunculifolia* and artemisinine by the bacterial reverse mutation test.** *Molecules* 2012, **7**(3):2335–2350.
2. Everist SL: *Poisonous plants of Australia*. Australia: Angus and Robertson Publishers; 1974:284–295.
3. Jain SK, Borthakur SK: **Etnobotany of the Mikers of India.** *Econ Bot* 1980, **34**(3):264–272.
4. Ko H, Weng J, Tsao L, Yen M, Wang J, Lin CA: **Anti-inflammatory flavonoids and pterocarpanoid from *Crotalaria pallida* and *C. assamica*.** *Bioorg Med Chem Lett* 2004, **14**:1011–1014.
5. Pelegrini PB, Farias LR, Saude ACM, Costa FC, Bloch C, Silva LP, Oliveira AS, Gomes EM, Sales MP, Franco OL: **A novel antimicrobial peptide from *Crotalaria pallida* seeds with activity against human and phytopathogens.** *Curr Microbiol* 2009, **59**:400–404.
6. Weng JR, Tsao LT, Yen MH, Wang JP, Lin CN: **Anti-inflammatory constituents and new pterocarpanoid of *Crotalaria pallida*.** *J Nat Prod* 2003, **66**:404–407.
7. Arzt J, Mount ME: **Hepatotoxicity associated with pyrrolizidine alkaloid (*Crotalaria* spp) ingestion in a horse on Easter Island.** *Vet Hum Toxicol* 1999, **41**:96–99.
8. Lin MW, Tsao LT, Huang LJ, Kuo SC, Weng JR, Ko HH, Lin CN, Lee MR, Wang JP: **Inhibition of lipopolysaccharide-stimulated NO production by crotafuran B in RAW 264.7 macrophages involves the blockade of NF- $\kappa$ B activation through the increase in I $\kappa$ B $\alpha$  synthesis.** *Toxicol Appl Pharmacol* 2006, **210**:108–115.
9. Santen RJ, Allred DC, Ardoin SP, Archer DF, Boyd N, Braunstein GD, Burger HG, Colditz GA, Davis SR, Gambacciani M, Gower BS, Henderson VW, Karas RH, Kleerekoper M, Lobo RA, Manson JE, Marsden J, Martin KA, Martin L, Pinkerton JV, Rubinow DR, Thiboutot DM, Utian WH: **Postmenopausal hormone therapy: an Endocrine Society scientific statement.** *J Clin Endocrinol Metab* 2010, **95**:1–66.
10. Sturdee DW, Pines A: **International Menopause Society Writing Group. Updated IMS recommendations on postmenopausal hormone therapy and preventive strategies for midlife health.** *Climacteric* 2011, **14**:302–320.
11. Boberg J, Mandrup KR, Jacobsen PR, Isling LK, Hadrup N, Berthelsen L, Elleby A, Kiersgaard M, Vinggaard AM, Hass U, Nellemann C: **Endocrine disrupting effects in rats perinatally exposed to a dietary relevant mixture of phytoestrogens.** *Reprod Toxicol* 2013, **40C**:41–51.
12. Castelo-Branco C, Soveral I: **Phytoestrogens and bone health at different reproductive stages.** *Gynecol Endocrinol* 2013, **29**:735–743.
13. Gaete L, Tchernitchin AN, Bustamante R, Villena J, Lemus I, Gidekel M, Cabrera G, Astorga P: **Daidzein-estrogen interaction in the rat uterus and its effect on human breast cancer cell growth.** *J Med Food* 2012, **15**:1081–1090.



14. Klein CB, King AA: **Genistein genotoxicity: critical considerations of *in vitro* exposure dose.** *Toxicol Appl Pharmacol* 2007, **224**:1–11.
15. García-Reyero N, Grau E, Castillo M, López de Alda MJ, Barceló D, Piña B: **Monitoring of endocrine disruptors in surface waters by the yeast recombinant assay.** *Environ Toxicol Chem* 2001, **20**:1152–1158.
16. Wagner H, Bladt S, Zgainski EM: *Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas.* Berlin: Springer; 2003.
17. Gordon MC, David JN: **Natural product drug discovery in the next millennium.** *Pharm Biol* 2001, **39**:8–17.
18. Kamboj A, Saluja AK: **Isolation of stigmasterol and  $\beta$ -sitosterol from petroleum ether extract of aerial parts of *Ageratum conyzoides* (Asteraceae).** *Int J Pharm Sci* 2011, **3**:94–96.
19. Green S, Chambon P: **The oestrogen receptor: from perception to mechanism.** In *Nuclear hormone receptors.* Edited by PARKER MG. London: Academic; 1991:15–38.
20. Schneider JC, Guarente L: **Vectors for expression of cloned genes in yeast: regulation, overproduction, and underproduction.** *Methods Enzymol* 1991, **194**:373–388.
21. García-Reyero N, Requena V, Petrovic M, Fischer B, Hansen PD, Díaz A, Ventura F, Barceló D, Piña B: **Estrogenic potential of halogenated derivatives of nonylphenol ethoxylates and carboxylates.** *Environ Toxicol Chem* 2004, **23**:705–711.
22. Brix R, Noguerol TN, Piña B, Balaam J, Nilsen AJ, Tollefsen KE, Levy W, Schramm KW, Barceló D: **Evaluation of the suitability of recombinant yeast-based estrogenicity assays as a pre-screening tool in environmental samples.** *Environ Int* 2010, **36**:361–367.
23. Maron DM, Ames BN: **Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test.** *Mutat Res* 1983, **113**:173–215.
24. Bernstein L, Kaldor J, McCann J, Pike MC: **An empirical approach to the statistical analysis of mutagenesis data from the *Salmonella* test.** *Mutat Res* 1982, **97**:267–281.
25. García-Reyero N, Piña B, Grimalt JO, Fernández P, Fonts R, Polvillo O, Martrat B: **Estrogenic activity in sediments from European mountain lakes.** *Environ Sci Technol* 2005, **15**(39):1427–1435.
26. Zand RS, Jenkins DJ, Diamandis EP: **Steroid hormone activity of flavonoids and related compounds.** *Breast Cancer Res Treat* 2000, **62**:35–49.
27. Ferguson LR: **Role of plant polyphenols in genomic stability.** *Mutat Res* 2001, **475**:89–111.
28. Le Bail JC, Varnat F, Nicolas JC, Habrioux G: **Estrogenic and antiproliferative activities on MCF-7 human breast cancer cells by flavonoids.** *Cancer Lett* 1998, **130**:209–216.
29. Ward HA, Kuhnle GG: **Phytoestrogen consumption and association with breast, prostate and colorectal cancer in EPIC Norfolk.** *Arch Biochem Biophys* 2010, **501**(1):170–175.
30. Choi SY, Ha TY, Ahn JY, Kim SR, Kang KS, Hwang IK, Kim S: **Estrogenic activities of isoflavones and flavones end their structure-activity relationships.** *Planta Med* 2008, **74**:25–32.
31. Awad AB, Fink CS: **Phytosterols as anticancer dietary components: evidence and mechanism of action.** *J Nut* 2000, **130**:2127–2130.
32. Svobodov H, Nonappa Wimmer Z, Kolehmainen E: **Design, synthesis and stimuli responsive gelation of novel stigmasterol-amino acid conjugates.** *J Colloid Interface Sci* 2011, **361**:587–593.
33. Šustekov J, Drasar P, Šaman D, Wimmer Z: **Stigmasterol-based novel low molecular weight/mass organic gelators.** *Molecules* 2011, **16**:9357–9367.
34. 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* 2011, **6**:9404–9420.
35. Rietjens IMCM, Boersma MG, Van der Woude H, Jeurissen SMF, Schutte ME, Alink GM: **Flavonoids and alkenylbenzenes: mechanisms of mutagenic action and carcinogenic risk.** *Mutat Res* 2005, **574**:124–138.
36. Fletcher MT, McKenzie RA, Blaney BJ, Reichmann KG: **Pyrrolizidine alkaloids in *Crotalaria* taxa from northern Australia: risk to grazing livestock.** *J Agric Food Chem* 2009, **57**:311–319.
37. Flores AS, Tozzi AMGA, Trigo JR: **Pyrrolizidine alkaloid profiles in *Crotalaria* species from Brazil: chemotaxonomic significance.** *Biochem Syst Ecol* 2009, **37**:459–469.
38. Sasaki YF, Yamada H, Shimoi K, Kinae N, Tomita I, Matsumura H, Ohta T, Sjiyasu Y: **Enhancing effects of heterocyclic amines and -carbolines on the induction of chromosome aberrations in culture mammalian cells.** *Mutat Res* 1992, **269**:79–95.
39. 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* 1983, **17**:249–255.
40. 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.** *Mutat Res* 1981, **90**:433–442.
41. Hazen MJ, Gutiérrez-González MG: **UV-mediated toxic bioactivity of harmine in the meristematic cells of *Allium cepa*.** *Mutagenesis* 1988, **3**:333–337.
42. Petzinger E: **Pyrrolizidine alkaloids and seneciosis in farm animals. Part 1: Occurrence, chemistry and toxicology.** *Tierarztl Prax Ausg G Grosstiere Nutztiere* 2011, **4**:221–230.
43. Loureiro APM, Di Massio P, Medeiros MHG: **Formação de adutos exocíclicos com bases de DNA: implicações em mutagênese e carcinogênese.** *Quim Nova* 2002, **25**(5):777–793.
44. Griffin DS, Segal HJ: **Genotoxicity and cytotoxicity of selected pyrrolizidine alkaloids, a possible alkenal metabolite of the alkaloids and related alkenals.** *Toxicol Appl Pharmacol* 1986, **86**:227–234.
45. De Jing A, Plat J, Mensink R: **Metabolic effects of plantsterols and stanols.** *J Nut Biochem* 2003, **14**:362–369.
46. Hui-Lian W, Qian-Rong L, Jian Y, Zhao-Feng L, Yu-Zhen W: **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* 2003, **1626**(1–3):19–24.
47. Lim JC, Park JH, Budesinsky M, Kasal A, Han YH, Koo BS, Lee SJ, Lee DU: **Antimutagenic constituents from the thorns of *Gleditsia sinensis*.** *Chem Pharm Bull* 2005, **53**(5):561–564.
48. Rezende JR, Rodrigues SB, Jabor IAS, Pamphile JA, Rocha CLMSC: **Efeito antimutagênico do látex de *Euphorbia tirucalli* no sistema metionina em *Aspergillus nidulans*.** *Biol Sci* 2004, **26**(4):481–484.

doi:10.1186/1472-6882-13-216

**Cite this article as:** Boldrin et al.: Estrogenic and mutagenic activities of *Crotalaria pallida* measured by recombinant yeast assay and Ames test. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 2013 **13**:216.

**Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:**

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at  
www.biomedcentral.com/submit

