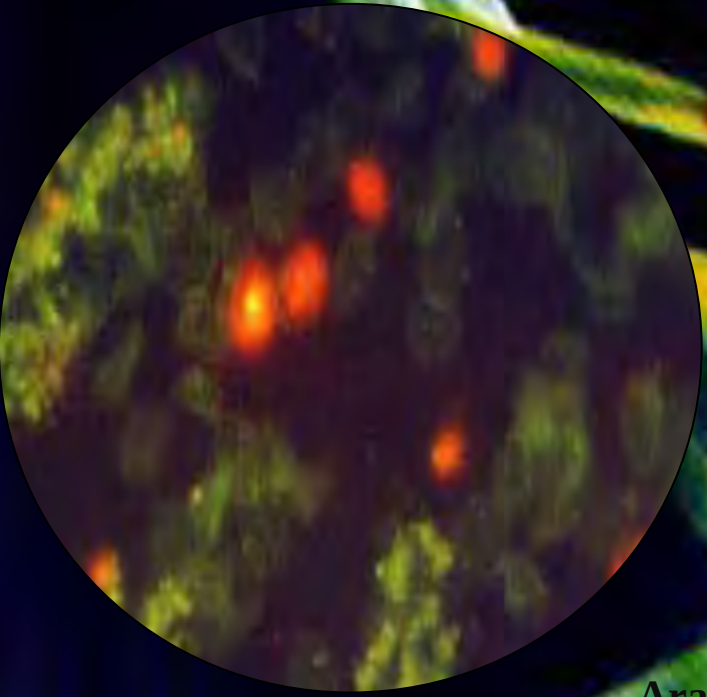
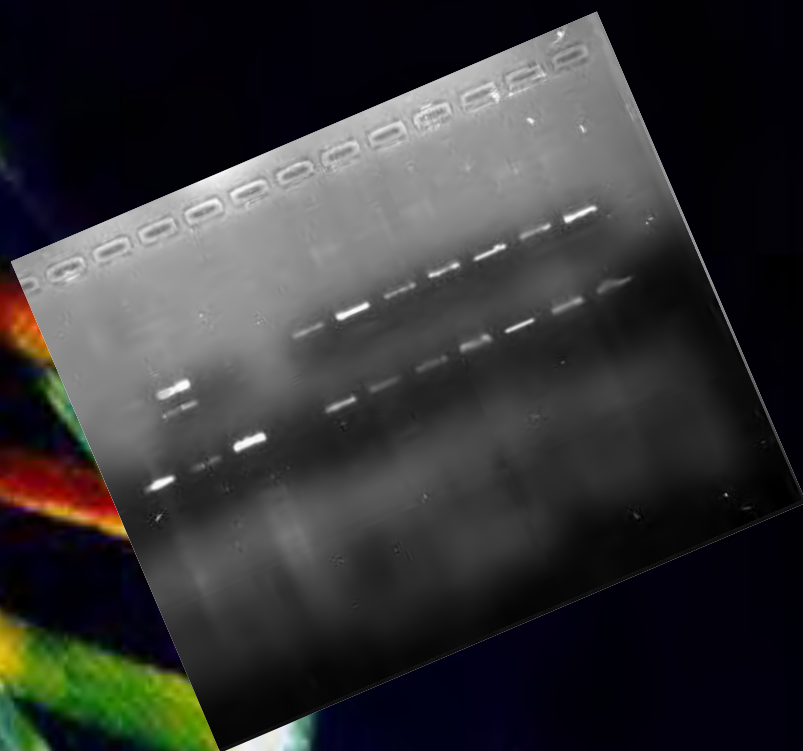




WALCLÉCIO MORAIS LIRA

Avaliação do potencial mutagênico e antimutagênico de extratos e compostos vegetais obtidos a partir dos gêneros Byrsonima e Davilla



Araraquara – SP
2007



Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Câmpus de Araraquara

unesp



WALCLÉCIO MORAIS LIRA

Avaliação do potencial mutagênico e antimutagênico de extratos e compostos vegetais obtidos a partir dos gêneros Byrsonima e Davilla

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor.

Orientadora: Prof^a Dr^a Eliana Aparecida Varanda

**Araraquara – SP
2007**

Banca Examinadora

Profa. Dra. Eliana Aparecida Varanda

Profa. Dra. Clarice Queico Fujimura Leite

Profa. Dra. Ilce Mara de Syllos Colus

Prof. Dr. Edson Luis Maistro

Profa. Dra. Soraya Duarte Varella

*À minha esposa Janaína, pelo carinho, apoio e compreensão
em todos os momentos.*

*Aos meus filhos Gabriel e Igor, pela alegria e pela força que
trouxeram ao meu viver, dando a minha vida um objetivo.*

Aos meus pais, José e Matildes, pelos ensinamentos, eterno carinho e amor, e pelo grande incentivo aos meus sonhos.

Às minhas irmãs Leomara, Walcléia e Walclécia, pelo amor e pela amizade sempre constante.

Ao meu sobrinho Bruno Aloísio Amâncio Lucena, por nossas conversas, apoio, socorro quando precisava de ajuda, sempre aí disposto a ajudar.

AGRADECIMENTOS

À DEUS, meu grande companheiro.

À Prof^ª Dr^a Eliana Aparecida Varanda, pelas oportunidades, confiança e imensa contribuição para o meu crescimento científico.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP, em especial ao Departamento de Ciências Biológicas, onde foi realizada toda parte experimental deste trabalho.

À amiga Prof^ª Dr^a Denise Crispim Tavares Barbosa, que ao longo dos anos tornou-se peça fundamental para o meu desenvolvimento científico, moral e acadêmico.

À amiga Soraya Varella, pelos ensinamentos, apoio, disposição, incentivo e paciência, sempre constantes. Pelo mais importante de tudo isso, sua amizade. Nós sabemos que, com certeza, não ocorreu por acaso, serei eternamente grato.

Ao meu amigo Fábio Vieira dos Santos, pelos ensinamentos, constantes, ajuda e parcerias em congressos. Acima de tudo pela sua amizade.

Aos amigos Adolfo Barreto, Ana Carolina Malaspina, que sempre estiveram ao meu lado dando força e me ajudando se medir esforços, contem sempre comigo.

Aos amigos Karina de Prince, Fernando Pavan, Faber Johanser e José Rodrigo Pandolfi, que juntamente com o Adolfo e a Carol, após a saída dos meus amigos e companheiros de laboratório, me adotaram no dia-a-dia em seu laboratório. Nossos cafés, almoços... saudades.

À Prof^ª Dr^a Clarice Queico Fujimura Leite, pela atenção, disponibilidade e contribuição para este trabalho.

Ao meu amigo Carlos Henrique Lopes Martins pelo apoio e longas conversas sempre de muito proveito.

Às colegas de laboratório Fabiana, Ana Paula, Mari, Vanessa, Cássia, Néia e Marisa.

À amiga Silvia, pelas conversas sempre proveitosas, pelo carinho e amizade.

Às secretárias da seção de pós-graduação, Laura, Sônia e Claudia pela paciência, atenção e ajuda.

Ao Prof. Dr. Wagner Villegas, á Miriam, Juliana e todos os alunos de graduação e pós graduação do laboratório de química orgânica do instituto de química da UNESP-Araraquara

À FAPESP e CNPq pelo apoio financeiro.

"Sei que meu trabalho é uma gota no oceano. Mas sem ele, o oceano seria menor..."

Madre Teresa de Calcutá

RESUMO

A investigação das plantas baseada na medicina popular tem sido intensificada com o objetivo de obter-se novas drogas capazes de promover a cura de algumas enfermidades, ou até mesmo prevenir a ação de componentes tóxicos presentes em medicamentos, alimentos e bebidas. Portanto, esta busca em sua grande maioria tem como base a biodiversidade dos diferentes tipos de vegetações existentes no mundo. Neste estudo foram avaliados extratos vegetais que têm sido utilizados na medicina popular. Para tanto, foram realizados ensaios *in vitro* (teste de Ames) e *in vivo* (micronúcleo), com a finalidade de avaliar o possível potencial antimutagênico de algumas espécies pertencentes aos gêneros *Byrsonima* e *Davilla*. Foi verificado os potenciais mutagênicos e antimutagênico dos extratos MeOH (metanólico) e CHCl₃ (clorofórmico) de *Byrsonima basiloba*, CHCl₃ de *Byrsonima crassa* e CHCl₃ de *Davilla ellyptica*. A verificação do possível potencial antimutagênico através dos testes de Ames e micronúcleo destes extratos mostrou que todos foram capazes de reduzir a atividade mutagênica da Aflatoxina B₁ (AFB₁), Benzo[a]pireno (B[a]P), Peróxido de Hidrogênio (H₂O₂), 4-o-nitrofenilenodiamina (NPD), Azida Sódica (AZS) e Mitomicina (MC), quando testados frente às linhagens TA97a, TA98, TA100, TA102. Os melhores índices de redução no número de colônias revertentes foram obtidos na linhagem TA98 com os extratos CHCl₃ de *B. basiloba* (95,29%) e CHCl₃ de *D. ellyptica* (94,9%) frente ao potencial do B[a]P. Para o teste de micronúcleos o melhor resultado foi obtido com o extrato CHCl₃ de *B. basiloba* (56%). Verificou-se também que quando utilizado a técnica de micronúcleo a resposta foi positiva contra o potencial da ciclofosfamida na concentração de 83,25mg/kg. Os testes realizados com as substâncias puras (Ác. gálico, Quercetina-3-o- α -L-raminopiranosídeo, Quercetina, Miricetina-3-o- α -L-raminopiranosídeo, Galato de metila, (+)catequina e Lupeol) demonstraram que apenas a quercetina foi mutagênica.

ABSTRACT

The investigation of the plants based in the popular medicine has been intensified with the aim to obtain new capable drugs to promote cures of some illnesses, or even to prevent the action of present toxic components in medicines, foods and beverages. So, this search in its big majority has as its basis the biodiversity of the different kinds of existing vegetations in the world. In this study, some vegetables extracts that have been used in the popular medicine were evaluated. For that, *in vitro* (Ames test) and *in vivo* (micronucleus) tests were realized, with the purpose of evaluating the possible mutagenic and antimutagenic potential of some species belonging to the kinds *Byrsonima* and *Davilla*. The mutagenic and antimutagenic potentials from extracts MeOH (metanolic) and CHCl₃ (cloroformic) of *Byrsonima basiloba*, CHCl₃ of *Byrsonima crass* and CHCl₃ of *Davilla ellyptica* were verified. The verification of the possible antimutagenic and mutagenic potentials through the Ames test and micronucleus of these extracts, showed that all of them were capable of reducing the mutagenic activity of the AflatoxinB1 (AFB1), Benzo[a]pyrene (B[a]P), Peroxide of Hydrogen (H₂O₂), 4-the-nitrophenylenodiamin (NPD), Azid Sodic (AZS) and Mitomicin (MC), when tested in face of the lineages TA97a, TA98, TA100, TA102. The mutagenicity tests showed that none of the extracts presented mutagenic activity. The best indexes of reduction in the number of revertents colonies were obtained in the lineage TA98 with the extracts CHCl₃ of *B. crassa* (95%) and CHCl₃ of *D. ellyptica* (95%) facing the potential of the B[a]P. For the micronucleus test the best result was obtained with the extract CHCl₃ of *D. elliptica* (51%). Also, it was verified that when the technique of micronucleus was used the answer was positive against the potential of the ciclophosfamide in the concentration of 83.25mg/kg. The tests realized with the pure substances (Ác. Galic, Quercetin-3-o- α -L-haminopiranosid, Quercetin, Miricetin-3-o- α - L-haminopiranosid, Galato de metila, (+)catequin e Lupeol) showed that just the quercetin was mutagenic.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA	DESCRIÇÃO	PÁGINAS
FIGURA 1.	Mapa de Biomas do Brasil.....	3
FIGURA 2.	Caule <i>Byrsonima</i> sp.....	11
FIGURA 3.	Florescência de <i>Byrsonima</i> sp.....	11
FIGURA 4.	folhas de <i>Davilla</i> sp.....	13
FIGURA 5.	Frutos de <i>Davilla</i> sp.....	13
FIGURA 6.	Percentual de inibição do extrato MeOH de <i>B. basiloba</i>	47
FIGURA 7.	Percentual de inibição do extrato MeOH de <i>B. basiloba</i>	47
FIGURA 8.	Percentual de inibição do extrato MeOH de <i>B. basiloba</i>	48
FIGURA 9.	Percentual de inibição do extrato CHCl ₃ de <i>B. basiloba</i>	52
FIGURA 10.	Percentual de inibição do extrato CHCl ₃ de <i>B. basiloba</i>	52
FIGURA 11.	Percentual de inibição do extrato CHCl ₃ de <i>B. basiloba</i>	53
FIGURA 12.	Percentual de inibição do extrato CHCl ₃ de <i>B. basiloba</i>	53
FIGURA 13.	Percentual de inibição do extrato CHCl ₃ de <i>B. crassa</i>	58
FIGURA 14.	Percentual de inibição do extrato CHCl ₃ de <i>B. crassa</i>	58
FIGURA 15.	Percentual de inibição do extrato CHCl ₃ de <i>B. crassa</i>	59
FIGURA 16.	Percentual de inibição do extrato CHCl ₃ de <i>B. crassa</i>	59
FIGURA 17.	Razões de mutagenicidade (RM).....	62
FIGURA 18.	Percentual de inibição do extrato CHCl ₃ de <i>D. elliptica</i>	66
FIGURA 19.	Percentual de inibição do extrato CHCl ₃ de <i>D. elliptica</i>	66
FIGURA 20.	Percentual de inibição do extrato CHCl ₃ de <i>D. elliptica</i>	67
FIGURA 21.	Percentual de inibição do extrato CHCl ₃ de <i>D. elliptica</i>	67
FIGURA 22.	Médias do número de micronúcleo por grupo de tratamento. Extrato MeOH de <i>Byrsonima basiloba</i>	74
FIGURA 23.	Médias do número de micronúcleo por grupo de tratamento. Extrato CHCl ₃ de <i>Byrsonima basiloba</i>	74
FIGURA 24.	Médias do número de micronúcleo por grupo de tratamento; Extrato CHCl ₃ de <i>Byrsonima crassa</i>	75
FIGURA 25.	Médias do número de micronúcleo por grupo de tratamento – Extrato CHCl ₃ de <i>Davilla elliptica</i>	75
FIGURA 26.	Foto do gel do teste mutagênico das substâncias puras isoladas dos extratos. na concentração de 0,9mg/mL.....	81
FIGURA 27.	Percentual de quebras. Controles positivos, negativos e tratamento associados controle positivo + compostos (0,9mg/mL e 0,45mg/ml).....	82
FIGURA 28.	Gel do teste antimutagênico das substâncias puras isoladas dos extratos na concentração de 0,9mg/mL.....	83
FIGURA 29	Gel do teste mutagênico das substâncias pura isoladas dos extratos na concentração de 0,45mg/mL.....	84

LISTA DE TABELAS

TABELA	DESCRIÇÃO	PÁG.
TABELA 1.	Atividade antimutagênica do extrato MeOH de <i>B. basiloba</i>	45
TABELA 2.	Atividade antimutagênica do extrato MeOH de <i>B. basiloba</i>	46
TABELA 3.	Perfil fitoquímico do extrato MeOH de <i>B. basiloba</i>	48
TABELA 4.	Atividade antimutagênica do extrato CHCl ₃ de <i>B. basiloba</i> frente a compostos mutagênicos diretos, utilizando.	50
TABELA 5.	Atividade antimutagênica do extrato CHCl ₃ de <i>B. basiloba</i> frente a compostos mutagênicos indiretos.....	51
TABELA 6.	Perfil fitoquímico do extrato clorofórmico de <i>B. basiloba</i>	54
TABELA 7	Atividade antimutagênica do extrato CHCl ₃ <i>B. crassa</i> frente a compostos mutagênicos diretos.....	56
TABELA 8	Atividade antimutagênica do extrato CHCl ₃ de <i>B. crassa</i> frente a compostos mutagênicos indiretos, utilizando.....	57
TABELA 9	Perfil fitoquímico do extrato clorofórmico de <i>B. crassa</i>	60
TABELA 10	<i>Atividade mutagênica do extrato CHCl₃ da planta Davilla elliptica em ausência e presença de ativação metabólica</i>	61
TABELA 11	Atividade antimutagênica o do extrato CHCl ₃ de <i>Davilla eliyptica</i> frente a compostos mutagênicos diretos.....	64
TABELA 12	Atividade antimutagênica do extrato CHCl ₃ de <i>Davilla elliptica</i> frente a compostos mutagênicos indiretos.....	65
TABELA 13	Perfil fitoquímico do extrato clorofórmico de <i>D. elliptica</i>	68
TABELA 14	Número de células micronucleadas por animal.....	69
TABELA 15	Avaliação antimutagênica dos extratos através do teste de micronúcleo em células de sangue periférico de camundongos tratados com ciclofosfamida.....	72
TABELA 16	Índices de redução do número de micronúcleos obtidos com os extratos testados.....	73
TABELA 17	Atividade mutagênica das substâncias isoladas dos extratos.....	77
TABELA 18	Atividade antimutagênica dos compostos isolado frente à mutágenos diretos e indiretos, utilizando a linhagem TA98 de <i>S. typhimurium</i>	79

ABREVIATÖES UTILIZADAS

°C	Graus Celsius
CE	Cloreto de Estando
µg	Micrograma
µL	Microlitro
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
SEM	Etilmetanossulfonato
LB	Meio Luria-Bertani
mL	Mililitro
mM	Milimolar
pH	Potencial de hidrogênio
TAE	Tris-acetato-EDTA
TE	Tris/EDTA
Tris	Tris (hydroxymethyl)aminomethane
+S9	Com Ativação Metabólica
-S9	Sem Ativação Metabólica
AMG	Agar Mínimo Glisado
ANOVA	Análise de Variância
AO	Acridine Orange
Ctrol-	Controle Negativo
Ctrol+	Controle Positivo
MeOH	Metanólico
MN	Micronúcleo
MNRET	Reticulócito Micronucleado
p.c	Peso Corpóreo
RM	Razão de Mutagenicidade
RNA	Ácido Ribonucleico
UV	Ultra-Violeta
CHCl3	Clorofórmico

SUMÁRIO

Capítulo I	PAG
1.INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Cerrado brasileiro.....	2
1.1.1 <i>Cerrado</i>	3
1.1.2 <i>O cerrado e as plantas medicinais</i>	4
1.2 Plantas da família <i>Malpighiaceae</i>.....	9
1.2.1 <i>Gênero Byrsonima</i>	10
1.3 Família <i>Dilleniaceae</i>.....	11
1.3.1 <i>Gênero Davilla</i>	12
1.4 Mutagênese e antimutagênese.....	13
1.4.1 Sistemas-teste para Avaliação de Mutagenicidade/Antimutagenicidade.....	17
1.4.1.1 <i>Teste de Ames</i>	17
1.4.1.2 <i>Micronúcleo</i>	18
1.4.1.3 <i>Danos no DNA Plasmidial</i>	20
2. OBJETIVOS.....	23
2.1 Objetivos Gerais.....	24
2.2 Objetivos Específicos.....	24
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	25
3.1 Material vegetal.....	26
3.2 Obtenção de Extratos e substâncias.....	27
3.2.1 Obtenção de substâncias puras.....	28
3.3 Concentrações utilizadas.....	28
3.3.1 Extratos.....	28
3.3.2 Substâncias puras.....	29

3.4 Avaliação da antimutagenicidade e mutagenicidade.....	29
3.4.1 Teste de Ames.....	29
3.4.1.1 Linhagens utilizadas.....	29
3.4.1.2 Manutenção e estoque das cepas de <i>Salmonella typhimurium</i>	30
3.4.1.3 Verificação das características genéticas das cepas de <i>S. typhimurium</i>	30
3.4.1.4 Taxa de reversão espontânea.....	31
3.4.1.5 Preparo do inóculo de <i>S. typhimurium</i> utilizados no ensaio.....	31
3.4.1.6 Controles.....	31
3.4.1.7 Ensaios de mutagenicidade.....	32
3.4.1.8 Ensaios de antimutagenicidade.....	32
3.4.1.9 Teste de viabilidade.....	33
3.5 Teste de micronúcleo.....	34
3.5.1 Animais.....	34
3.5.2 Preparo das lâminas com Acridine Orange.....	35
3.5.3 Obtenção do sangue e preparo das células.....	35
3.5.4 Ensaio de antimutagenicidade.....	35
3.5.5 Ensaio de mutagenicidade.....	37
3.5.6 Análise Estatística dos Resultados.....	38
3.6 Teste do plasmídeo.....	38
3.6.1 Procedimento	39
3.6.2 Isolamento do plasmídeo.....	39
3.6.3 Quantificação do DNA plasmidial extraído.....	39
3.6.4 Tratamento do DNA plasmidial.....	40
3.6.5 Análise dos resultados.....	40
4. RESULTADOS.....	42
4.1 Teste de Ames.....	43

4.1.1 <i>Byrsonima basiloba</i>	43
4.1.2 <i>Byrsonima crassa</i>	54
4.1.3 <i>Davilla ellyptica</i>	60
4.2 Teste do micronúcleo	69
4.2.1 Mutagenicidade.....	69
4.2.2 Antimutagenicidade.....	70
4.3 Substâncias Isoladas.....	76
4.3.1 Teste de Ames	77
4.3.2 Teste do Plasmídeo.....	80
5. DISCUSSÃO	85
5.1- Extratos	86
5.2 Substâncias Isoladas.....	96
6 CONCLUSÕES	106
7 REFERÊNCIAS	114
 Capítulo II	
1. ARTIGO PUBLICADO.....	136

1. INTRODUÇÃO

1.1 Cerrado brasileiro

É fato que o Brasil possui umas das maiores biodiversidades do mundo, graças ao tamanho e localização do seu território, quinto maior do planeta. Ocupa uma área de 8.511.965 Km², distribuída desde aproximadamente 5°N a 34°S entre o equador e o trópico de capricórnio. Por estar próximo ao equador, apresenta uma grande variedade climática. Embora o clima predominante no Brasil seja o equatorial, também se pode encontrar tropical úmido, tropical típico ou semi-úmido, semi-árido e subtropical (JUNIOR, 2006).

Devido à sua extensão, o Brasil apresenta diferentes biomas, precisamente seis, sendo que o bioma Amazônia é o maior, com aproximadamente 4.196.943km², o que equivale a 49,9% da área total do território brasileiro; seguido pelo bioma Cerrado com 2.036.448km² o que representa 23,92% da área total do Brasil. O bioma Mata Atlântica com 1.110.182km² é o terceiro maior, sua área ocupada representa 13,04% do território nacional. A Caatinga, com apenas 9,92% do território brasileiro, ocupa 844.453km² e vem seguida pelo bioma Pampa com 176.496km² que representa 2,07% e Pantanal com 150.355km² correspondente a 1,76% que são os menores do país (Figura 1- IBGE, 2004).



Figura 1: Mapa de Biomas do Brasil.
Fonte: IBGE, 2004.

O Brasil apresenta várias formações vegetais devido às diversidades no clima e extensão territorial. Os principais tipos de vegetação encontrados no Brasil são: Floresta Amazônica, Floresta Latifoliada Tropical, Mata de Araucárias ou Pinhais, Mata dos Cocais, Caatinga, Cerrado, Complexo do Pantanal, Campos Naturais e Vegetação Litorânea. Dentre essas destacamos o Cerrado.

1.1.1 Cerrado

O termo cerrado é comumente utilizado para designar o conjunto de ecossistemas compostos por matas, savana campos e matas de galerias que ocorrem no Brasil central (EITEN, 1977; RIBEIRO et al., 1981).

O cerrado brasileiro ocupava uma área de aproximadamente dois milhões de km² há seis mil anos, tamanho esse que varia de acordo com a inclusão ou não de áreas de transição presentes nas extremidades da área central deste bioma (MACHADO, 2004).

Cerca de 50% de toda área do cerrado já foi transformada pela ação do homem em pastagem ou em áreas de culturas anuais como o cultivo da soja e gramíneas, principalmente as de origem africana, que hoje ocupam uma área equivalente à área territorial da Espanha (KLINK e MACHADO, 2005).

O cerrado apresenta cerca de 7.000 espécies vegetais entre plantas herbáceas, arbustivas, arbóreas e cipós (MENDONÇA et al., 1998). Esta diversidade está dividida em uma fito fisionomia, composta desde formas campestres abertas como o campo limpo de cerrado até às formas densas como o cerradão.

1.1.2 O cerrado e as plantas medicinais

O uso de plantas medicinais é uma das mais antigas práticas realizadas pelo homem, sendo, ainda hoje, muito difundida em todo o mundo. De acordo com a Organização Mundial da Saúde, cerca de 80% da população mundial faz uso de tratamentos ou medicamentos sugeridos pela chamada medicina popular (CRAGG et al., 1995 apud BASSO et al., 2005).

Existe uma vasta fonte de informações, nas culturas antigas, acerca de plantas com potencial farmacológico e estudos científicos estão sendo desenvolvidos, para comprovação da eficiência e a eficácia dessas plantas e formulações. O cerrado, por ser um bioma rico em espécies vegetais, vem sendo amplamente utilizado em várias pesquisas, como fonte de material vegetal para o desenvolvimento de estudos de comprovação do potencial farmacológico de vegetais utilizados pelas populações no combate a enfermidades.

Em trabalho recente, Borba e Macedo (2006) avaliaram a utilização de plantas do cerrado no combate a enfermidades bucais na comunidade de Santa Cruz, Chapada dos Guimarães e Mato Grosso. Este trabalho foi realizado através de

entrevistas com a população local. Foram citadas 87 espécies pertencentes a 48 famílias diferentes do bioma cerrado ou cultivado nos quintais dos entrevistados. Entre as aplicações mais comuns, temos a utilização, para a erupção dentária, da camomila (*Matricaria chamomilla* L.); para candidíases, estomatites, gengivites e afta, o açafraão (*Crocus sativus* L.) e, para dor de dente, a arnica-da-serra (*Brickelia brasiliensis* (Spreng.) Robinson). Pessoas idosas, líderes comunitários, parteiras e benzedadeiras entrevistadas apresentaram um maior conhecimento sobre o assunto.

No estudo realizado com 27 espécies pertencentes a oito famílias diferentes de plantas, obtidas do cerrado brasileiro, verificou que, 32 dos 204 extratos obtidos, cerca de 15,%, foram eficientes contra o crescimento do *Plasmodium falciparum* que é o agente causador da malária (DE MESQUITA, 2007).

Austroplenckia populnea é uma planta encontrada no cerrado, conhecida popularmente como marmelinho do campo, mangabeira-brava, mangabarana e vime, muito utilizada pela população contra processos inflamatórios, anti-úlceras, analgésico entre outras. Utilizando o extrato bruto, frações hexânica, clorofórmica e acetato de etila desta planta, constatou-se que houve uma redução significativa dos processos inflamatórios induzidos em diferentes grupos de tratamento e diferentes espécies animais (ANDRADE, et al. 2007).

A biodiversidade vem a cada dia, sendo o foco de vários estudos desenvolvidos pelos mais variados segmentos de pesquisas, pois, sabe-se que os componentes encontrados na natureza podem e já estão fornecendo uma ampla variedade de produtos de interesse médico e industrial.

É evidente que os produtos obtidos através de estudos científicos são também de grande interesse econômico e, dentre eles, podemos destacar os fitoterápicos e os fitofármacos.

Fitoterápicos são definidos como sendo os medicamentos originados exclusivamente de plantas medicinais, como é o caso da sete-sangrias (*Cuphea carthagenensis*), que apresenta propriedades laxativa, diurética, entre outras (DICKEL, et al 2007) e espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia*) que é utilizada no combate a lesões gástricas e como analgésico (TIBERT, et al. 2007).

Fitofármacos são as substâncias que foram extraídas de plantas com atividade farmacológica que podem ser utilizadas em terapias. Como por exemplo, temos o jaborandi (*Pilocarpus spp*), que fornece a pilocarpina extraída de sua folha e que é utilizada no tratamento do glaucoma (GUERRA E NODARI in SIMÕES et al., 2004).

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

Os estudos com plantas medicinais tiveram uma reorientação com o início do novo milênio principalmente devido ao surgimento de novos métodos analíticos de alta tecnologia, os quais permitem isolar componentes presentes nas plantas mesmo que em baixas quantidades. Além disso, favorecem o desenvolvimento de novos modelos biológicos que permitem a triagem de compostos isolados, tanto através de testes *in vivo* quanto *in vitro*, levando a elucidação de mecanismos de ação de extratos e compostos isolados de vegetais (WAGNER in YUNES E FILHO, 2007).

O uso dos fitoterápicos não visa a substituição de medicamentos já registrados e comercializados, mas tem como principal objetivo aumentar as opções terapêuticas, e fornecendo uma terapia, mais barata e com espectro de atividade mais direcionado que os já comercializados, ou até mesmo como medicação complementar a medicamentos já utilizados (LAPA, et al., in SIMÕES et al., 2004).

A utilização de fitoterápicos era a terapia quase exclusiva até 1950, mas, foram paulatinamente sendo substituídos por medicamentos contendo substâncias extraídas dos vegetais. Outro aspecto não menos importante da utilização de fitoterápicos é a valorização das tradições populares (LAPA, et al., in SIMÕES et al., 2004).

Acredita-se que as plantas são tradicionalmente utilizadas no combate a enfermidades e pragas em todos os continentes a milhares de anos e que o mercado de fitofármacos e fitoterápicos gira em torno de US\$ 9 a 11 bilhões/ano, com a utilização de aproximadamente 13.000 plantas em todo o mundo como fármacos ou fonte de fármacos. (TYLER, 1994).

Cerca de 40% dos medicamentos utilizados na terapia moderna tem origem natural com aproximadamente 25% de origem vegetal, 13% de microrganismos e 3% de origem animal. Em cinco anos nos Estados Unidos foram aprovados cerca de 200 novos medicamentos de origem natural. Além disso, 50% dos medicamentos mais vendidos no ano de 1998 já eram desenvolvidos a partir de produtos naturais. Quando se analisam as drogas anticancerígenas e antimicrobianas, vemos que cerca de 70% são originados a partir de produtos naturais (YUNE e CALIXTO, 2001).

No Brasil, o aumento na demanda de produção de plantas medicinais tem levado a perda de qualidade. Acredita-se que aproximadamente 50% dos produtos fitoterápicos disponíveis no mercado apresentam irregularidade que vão desde a presença de matéria orgânica estranha até erro de identificação botânica (REIS in SIMÕES et al., 2004).

De certa maneira a informação anterior de que 50% dos produtos fitoterápicos vendidos no Brasil encontram-se ilegais é preocupante, pois, já é sabido que a utilização de produtos fitoterápicos sem controle traz prejuízos a saúde do usuário.

Como exemplo, a utilização de *Senna alexandrina*, *Aloe vera* e *Rhamnus frangula* como laxativos, estão relacionadas a dores abdominais e problemas cardíacos; plantas como *Areca catechu*, *Ephedra sinica* e *Paullinia cupana*, utilizadas como estimulantes estão sendo relacionadas com disfunções hepáticas, agitação, palpitações e insônia. Além de casos de hepatotoxicidade que também são associados à utilização destes vegetais (ELVIN-LEWIS, 2001). Além disso, a regulamentação da formulação de medicamentos varia de acordo com a região, mas em grande parte dos países, ainda é ineficaz. Na Europa os padrões regulatórios variam de país para país e assim não se pode assegurar a composição exata, a eficiência ou a segurança de praticamente nenhum medicamento derivado de plantas (ELVIN-LEWIS, 2001).

É comum encontrar entre os constituintes de extratos vegetais compostos com ação citotóxica ou genotóxica que podem ser associados ao desenvolvimento de tumores (AMES, 1983).

Devido a fatos como os citados acima, o desenvolvimento de novos fármacos geralmente requer a colaboração multidisciplinar envolvendo disciplinas como botânica, microbiologia, química, biologia molecular, genética, farmacologia, toxicologia, entre outras (NEWMAN in YUNES E FILHO, 2007).

Por ser um processo que engloba várias disciplinas, a descoberta e regularização de compostos envolvem várias etapas de aprovação, entre elas os testes de citotoxicidade e genotoxicidade. Entre os vários ensaios utilizados para determinar a mutagenicidade, temos o teste de Ames, micronúcleos que são alguns dos mais utilizados.

No Brasil o órgão responsável pela regulamentação de novos fitoterápicos é a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), que após consulta pública de nº. 94 realizada em 6 de novembro de 2003 estabeleceu a Resolução RDC nº. 48 em 16 de março de 2004 que estabelece normas no controle de qualidade química, estudos de

citotoxicidade, eficácia e indicações terapêuticas dos fitoterápicos (CARDOSO in YUNES E FILHO, 2007). A Resolução nº. 90 de 2004 estabelece que todo medicamento fitoterápico deve ser avaliado quanto à sua toxicidade aguda ou por doses repetidas, bem como quanto à genotoxicidade. Para a avaliação da genotoxicidade, caso os fitoterápicos sejam utilizados em tratamentos de longa duração, a ANVISA preconiza o uso dos testes de Ames e micronúcleo.

O teste de Ames é um dos ensaios de triagem mais utilizados para detectar o potencial mutagênico de compostos (CARIELO E PIEGORSCH, 1996; UMBUZEIRO E VARGAS in RIBEIRO, et al. 2003).

Da mesma maneira, o teste do micronúcleo é amplamente utilizado e aceito por agências internacionais e governamentais como parte dos testes necessários para o fornecimento de registro de novos produtos químicos e farmacológicos (CHOY 2001).

1.2 Plantas da família Malpighiaceae

A família Malpighiaceae é composta, aproximadamente, de 1250 espécies distribuídas em 71 gêneros, sendo que, deste total, cerca de 950 espécies pertencem a 47 gêneros e encontram-se distribuídas pelo mundo. Basicamente, esta família está distribuída ao longo dos trópicos e subtropicais (MAKINO-WATANABE, 1988). A maioria das espécies (cerca de 70%) está na América tropical onde são encontrados, geralmente, em locais abertos como florestas, cerrados, campos e matas ciliares (ANDERSON, 1979).

No Brasil, encontram-se cerca de 300 espécies distribuídas por todas as regiões e são classificadas como pertencentes a 32 gêneros de Malpighiaceae. Essa

família geralmente apresenta hábito trepador, mas também pode ser encontrada como arbusto e ocasionalmente erva perene (JUDD, et al. 1999).

Segundo Judd, et al. (1999), a distribuição das espécies dentro dos respectivos gêneros é a seguinte: *Byrsonima* (150 ssp), *Heteropterys* (120 ssp), *Banisteriopsis* (92 ssp), *Teraptyrys* (90).

1.2.1 Gênero *Byrsonima*

O gênero *Byrsonima*, é nativo do cerrado brasileiro e utilizado pela população desta região no tratamento de enfermidades, como infecções cutâneas e disfunções gástricas (AMARQUAVE et al., 1994). A espécie *Byrsonima crassa* é popularmente conhecida como murici-cascudo ou murici-vermelho e a literatura relata os efeitos anti-micótico (CÁCERES et al., 1993) e bactericida (MARTINEZ-VASQUES et al., 1999). Estudos fitoquímicos realizados com extratos desta espécie demonstraram a presença de alguns compostos biologicamente ativos como quercetina-3-*O*- β -galactopiranosideo, quercetina-3-*O*- α -1-arabinopiranosideo, amentoflavona, (+)-catequina e (-)-epicatequina (SANNOMIYA et al., 2004; SANNOMIYA et al., 2005). Em estudo realizado pelo mesmo grupo, foi possível verificar que os extratos metanólico água (80% MeOH), metanólico (MeOH) e clorofórmico (CHCl₃), quando administrados por via oral em ratos na dosagem de 250, 500 e 1000 mg/kg, ocasionaram uma redução no número de lesões gástricas promovidas pelo HCl/etanol.(AMARQUAVE et al., 1994)

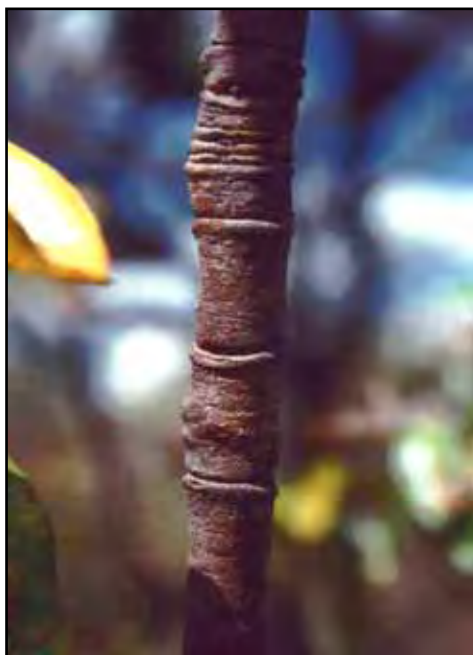


Figura 2:Caule Byrsonima sp

Fonte: Manoel Cláudio da Silva Junior



Figura 3: Florescência de Byrsonima sp

Fonte: Manoel Cláudio da Silva Junior

1.3 Família *Dilleniaceae*

A Família Dilleniaceae é composta por, aproximadamente, 18 gêneros e cerca de 530 espécies de árvores, arbustos e lianas lenhosas, amplamente distribuídas no Brasil. No Brasil, ocorrem cinco gêneros e 31 espécies, com centros de diversidade nas regiões do nordeste, onde várias espécies estão adaptadas à caatinga nordestina, cerrado e floresta amazônica. Nos Estados de Goiás e Tocantins ocorrem quatro gêneros e cerca de oito espécies: *Curatella americana* L. popularmente conhecidas pelos nomes de “lixreira” e “sambaíba”; *Davilla rugosa* Poir., *D. elliptica* St. Hil., *D. nítida* (Vahl) Kub. e *D. grandiflora* St. Hil, possuem hábito arbustivo e são conhecidas pela população local como “lixieirinhas”, sendo de ampla ocorrência nos cerrados; *Doliocarpus dentatus* (Aubl.) Standl. e *D. elegans* Eichl. “cipó-de-fogo” e “cipó-d’água” são lianas lenhosas e estão associados às florestas úmidas e de galeria e cerradão; *Tetracera willdenoviana* Steud., outra espécie de liana lenhosa, de ocorrência nas florestas regionais. Atualmente, algumas novas espécies têm sido descritas em várias regiões neotropicais para mostrar a

necessidade de estudos regionais mais profundos, e gerar melhor conhecimento da região do cerrado, tão ameaçado pelo avanço das atividades agropecuárias. (PEREIRA, 2005).

1.3.1 Gênero *Davilla*

Davilla elliptica é conhecida popularmente como “lixinha”, devido à aspereza de suas folhas. Floresce de abril a junho e sua época de frutificação é de julho a setembro. Apresenta porte médio de 1,50m, caracterizando-se como subarbustos. Na medicina popular, o infuso das raízes é utilizado como adstringente tônico e laxativo, possuindo forte efeito purgativo. Já o banho com folhas frescas é indicado em caso de linfatismo, inchações e orquites (RODRIGUES & CARVALHO, 2001).

Coelho et al. (2005) relataram o emprego destas plantas como fármaco de primeira escolha no tratamento de enfermidades, pela população da comunidade Mumbuca, localizada na região Oeste do Estado do Tocantins. Esta espécie, conhecida pelo nome de lixeirinha, é utilizada pelos locais na forma de infusão como analgésico.

Trabalhando com o gênero *Davilla*, Guaraldo et al. (2001), verificaram que a utilização do extrato hidroalcoólico foi capaz de reduzir o número de lesões gástricas produzidas por HCL/etanol (400mg/kg de peso corpóreo) em camundongos.



Figura 4: folhas de *Davilla sp*
Fonte: Manoel Cláudio da Silva Junior



Figura 5: Frutos de *Davilla sp*
Fonte: Manoel Cláudio da Silva Junior

1.4 Mutagênese e antimutagênese

O material genético da maioria dos organismos vivos, apesar de encontrar-se no interior das células, imerso no citoplasma, protegido por membranas, imerso no citoplasma e com uma maquinaria de reparo, não está livre de sofrer constantes alterações, ou seja, mutações.

Essas alterações, as quais esta sujeita o material genético, podem ser originadas através de erros ocorridos durante o processo de duplicação e divisão celular e, embora a maioria das pessoas associe o evento mutacional com processos lesivos, as mutações têm grande importância no processo evolutivo, portanto, são responsáveis pelo surgimento de novos fenótipos (MARQUES apud RIBEIRO, et al., 2003).

As mutações podem ser classificadas em gênicas ou puntiformes quando atingem poucos nucleotídeos ou aberrações cromossômicas, quando atingem cromossomos inteiros ou pedaços de cromossomos. Basicamente as mutações gênicas podem ser subdivididas em substituição de pares de bases e alteração na matriz de leitura, ocorrendo por adição ou deleção de nucleotídeos. As cromossômicas podem ser

divididas em numéricas e estruturais, que por sua vez são subdivididas de acordo com o tipo (GRIFFITHS et al., 2006).

Quando a alteração no material genético afeta células somáticas, os efeitos são observados no próprio indivíduo, pois é possível observar diminuição ou perda de função da célula atingida, podendo chegar ao desenvolvimento de neoplasias. Entretanto, quando a alteração ocorre no material genético de células germinativas, os efeitos destas alterações são observados na prole, que apresenta desde disfunções orgânicas até a morte do indivíduo (GRIFFITHS et al., 2006).

Estas alterações, segundo Lewin (2001), podem ser decorrentes de processos celulares normais (mutações espontâneas) ou devidas à exposição do organismo a agentes químicos ou físicos (mutações induzidas).

Vale ressaltar que, diariamente, milhares de pessoas estão expostas a agentes indutores de mutação nas suas atividades, como é caso dos agricultores que, freqüentemente, utilizam agrotóxicos citotóxicos e genotóxicos para células humanas (HOYOS et al., 1996; LIOI et al., 1998; MARQUEZ et al., 2005)

Sem dúvida, as mutações são de grande interesse para a sociedade de modo geral, pois estão diretamente envolvidas em processos iniciadores de doenças degenerativas tais como câncer e arteriosclerose (DE FLORA, 1998; SEO et al., 2000).

Sabendo que a mutação é um dos eventos iniciadores do câncer, o combate ou a prevenção da ocorrência de eventos mutacionais seria o caminho a ser desenvolvido na tentativa de prevenir essas mutações, ou seja, a utilização de substâncias que funcionem como antimutagênicos. De acordo com Waters e McCuthan (1990), o termo “antimutagênico” foi primeiramente utilizado por Novick e Szilard em 1952 para descrever aqueles agentes que apresentam a propriedade de reduzir a taxa de mutações espontâneas ou induzidas, independentemente dos mecanismos envolvidos. Esses agentes antimutagênicos têm a capacidade de prevenir a intervenção de um

mutágeno com DNA, promovendo danos, ou modulação da resposta após a interação mutágeno-DNA, amenizando os efeitos causados (FIORIO, 1994; NAMIKI, 1990).

A prevenção do desenvolvimento do câncer, através de substâncias químicas que funcionem como agentes antimutagênicos e que tenham a capacidade de interagir com compostos mutagênicos ou seus metabólitos a fim de reduzir os seus efeitos, é uma alternativa promissora, chamada, a quimioprevenção (ROY et al., 2003).

Estudos recentes mostram que os extratos vegetais têm um grande potencial para serem utilizados na medicina como substâncias capazes de prevenir danos causados ao organismo humano, e que a introdução de medicamentos originados de vegetais, provavelmente, não terá problema de aceitação por parte da população que já utiliza produtos de origem natural no combate de algumas enfermidades (CORDELL, 1995). Por exemplo, a formação de radicais livres é amplamente investigada como fator de iniciação do câncer (LAKSHMI et al., 2003) e, substâncias que tenham a capacidade de impedir a formação destes radicais livres, são de interesse médico e industrial. As fontes pesquisadas são as mais variadas possíveis: frutos, folhas, caules, raízes dos vegetais, fungos como cogumelos que são utilizados na medicina popular.

São vários os trabalhos que demonstram a atividade antimutagênica de extratos e de diferentes compostos naturais destes extrato, como por exemplo, *Camellia sinensis*, *Camellia assamica* (TANEJA et al., 2003).

Utilizando o teste de Ames, Varella et al. (2001) avaliaram o potencial mutagênico e antimutagênico de *Mormodica charantia* e constataram que o extrato desta planta, utilizada na medicina popular, é capaz de atuar como antimutagênico, quando testado frente a indutores de mutações como a azida sódica, 4-*o*-nitrofenilenodiamina (NPD), daunomicina, 2-antramina e 2-aminofluoreno.

Testes realizados com rabanete (*Raphanus sativus*), um vegetal pertencente à família Cruciferae, comprovaram a atividade de redução aos danos

causados pelas aminas heterocíclicas. Esta verificação foi feita através do teste de Ames com as linhagens TA98 e TA100 (SHISHU & KAUR, 2003).

Avaliação realizada com feijão preto (*Phaseolus vulgaris L.*), através do teste de micronúcleo em medula óssea e sangue periférico de camundongos e teste do cometa, demonstraram que animais, em dieta suplementada com feijão preto, tiveram uma redução significativa nos danos causados ao DNA quando tratados com ciclofosfamida (AZEVEDO, 2004).

Em trabalho realizado por Geetha et al. (2004), demonstraram que o extrato do chá verde foi capaz de reduzir significativamente o número de colônias revertentes para a linhagem TA102, quando testado frente a peróxido de hidrogênio que é uma substância com potencial de causar danos oxidativos ao DNA.

Bukova et al. (2005) também verificaram o efeito antimutagênico do chá verde. Utilizando o teste de Ames, constataram uma redução de até 74% quando os ensaios foram realizados com ativação metabólica.

Em estudo recente, Resende et al. (2006), utilizando o teste do micronúcleo demonstraram que os ácidos ursólico e oleanólico extraídos de *Miconia fallax* são eficientes quando testados contra o efeito mutagênico da doxorubicina. Os grupos que foram tratados simultaneamente com esses ácidos e a doxorubicina chegaram a reduzir em até 78% o número de micronúcleos quando comparados com o grupo controle.

Através do teste de Ames, utilizando as linhagens TA98 e TA100, as substâncias atorvastatina e lovastatina apresentaram potencial antimutagênico contra a atividade mutagênica do NPD e azida sódica (AJITH e SOJA, 2006).

O efeito antimutagênico do extrato das flores de *Melampodium divaricatum*, avaliado através de ensaios de mutação gênica reversa com *Salmonella*

typhimurium, foi atribuído principalmente à presença de triterpenos (NOGUEIRA et al. 2006).

Em ensaios realizados com flores de *S. pilosa* e *Stevia eupatoria* para avaliar o potencial antimutagênico destes vegetais, foi verificado, através do teste de Ames, que *Stevia pilosa* reduziu em até 99% os efeitos mutagênicos de *N*-etil-*N*-nitro-*N*-nitrosoguanidina na linhagem TA100 (CARIÑO-CORTÉS et al., 2007).

1.4.1 Sistemas-teste para Avaliação de Mutagenicidade/Antimutagenicidade

1.4.1.1 Teste de Ames

O teste de Ames tem sido amplamente utilizado para identificar mutágenos entre substâncias puras, misturas complexas e amostras ambientais. Caracteriza-se pela utilização de linhagens indicadoras de *S. typhimurium* sensíveis a substâncias capazes de induzir diferentes tipos de mutação. Na presença de agentes mutagênicos, estas linhagens reverterem seu caráter de auxotrofia para a síntese de histidina e passam a formar colônias em meio desprovido desse aminoácido. Desta forma, através da contagem de colônias por placa, é possível estabelecer a ação mutagênica e antimutagênica de um composto em função de sua concentração (ZEIGER, 2001). Um considerável número de mutágenos, primeiramente identificados pelo teste de Ames, mostrou-se carcinogênicos em ensaios com animais (MARON e AMES, 1983). Isso faz com que esse teste seja um dos principais ensaios empregados na determinação da mutagenicidade e antimutagenicidade de um grande número de compostos químicos (UMBUZEIRO e VARGAS, 2003).

Existe uma variedade de linhagens bacterianas que podem ser empregadas neste ensaio. Cada uma delas apresenta várias mutações específicas que

resultam, além da incapacidade de sintetizar histidina, em outras características particulares, que as tornam mais hábeis para a identificação de diferentes classes de agentes químicos mutagênicos (MARON e AMES, 1983).

As mutações no operon histidina também são diferentes de acordo com a linhagem, e essas diferenças permitem identificar o mecanismo de ação de diferentes agentes químicos, isto é, determinadas linhagens permitem a identificação de agentes mutagênicos que causam substituição de pares de bases. Outras linhagens permitem a identificação de agentes químicos que causam mutações do tipo *frameshift* (MARON e AMES 1983; MORTELSMANS e ZEIGER, 2000). Entretanto, as linhagens bacterianas não apresentam enzimas de metabolização, o que impossibilita sua capacidade para identificação de agentes mutagênicos de ação indireta. Para superar essa dificuldade, adiciona-se às culturas durante os ensaios a chamada fração S9, que contém enzimas metabolizadoras de xenobióticos que é obtida a partir do fígado de ratos (MARON e AMES 1983; MORTELSMANS e ZEIGER, 2000).

Todas essas características conferem ao teste de Ames uma grande capacidade de identificação e caracterização de diferentes agentes mutagênicos e antimutagênicos, com grande eficiência e sensibilidade.

1.4.1.2 *Micronúcleo*

Micronúcleos têm sido estudados há muitos anos e frequentemente usados para quantificar a exposição a agentes químicos ou à radiação e são, atualmente, também empregados para estudos de agentes antimutagênicos.

Os micronúcleos foram primeiramente descritos por Howell em 1891 como inclusões citoplasmáticas em células vermelhas do sangue de gatos anêmicos.

Jolly observou essas mesmas estruturas em 1901 em seus estudos com eritrócitos de embriões de ratos (SLESINSKI e GUZZIE, 1988)

Segundo Heddle et al. (1983), diferentes mecanismos podem estar envolvidos na formação dos micronúcleos, incluindo quebras cromossômicas (clastogênese) e rompimento das fibras do fuso mitótico (aneuploidiogênese). Esses mecanismos levam a formação de um “pequeno núcleo”, envolto por membrana (micronúcleo), isolado do núcleo principal, mas corado similarmente a este, devido ao seu conteúdo de DNA (SLESINSKI e GUZZIE, 1988).

Embora os micronúcleos possam ser originados espontaneamente, a sua indução é comumente usada para se detectar danos genotóxicos, resultantes de exposição a agentes mutagênicos (HEDDLE et al., 1983; MAJER et al., 2001). O teste do micronúcleo é uma alternativa à análise de aberrações cromossômicas, entretanto, somente um, as quebras e perdas cromossômicas aparecem como micronúcleos (GRAWÉ et al., 1998).

De acordo com Surrallés e Natarajan (1997), as principais vantagens da análise de células micronucleadas são a velocidade e a facilidade com que este tipo de estudo pode ser efetuado, especialmente quando são aplicados em roedores em estudos *in vivo*, além de permitir a inferência de processos de aneugênese e clastogênese.

Hayashi et al. (1990) descreveram uma técnica para a análise de células micronucleadas do sangue periférico de camundongos com a utilização de lâminas pré-coradas com o corante fluorescente *acridine orange*, que proporciona coloração amarela ao DNA e vermelha ao RNA. Essas propriedades permitem a identificação dos reticulócitos, eritrócitos jovens ricos em RNA em nível de citoplasma, que se coram em vermelho pela presença desse ácido nucléico. Os micronúcleos, por seu conteúdo de DNA, coram-se em amarelo e se tornam muito evidentes nestas células.

Segundo Kishi et al. (1992), em estudos comparativos entre a técnica convencional de coloração por Giemsa de células da medula óssea de camundongos e a técnica de coloração descrita por HAYASHI et al. (1990), não houve divergência nos resultados, sendo que, a última técnica utilizada mostrou-se tão sensível quanto a primeira. Ainda segundo esses mesmos autores, esse método que utiliza lâminas pré-coradas com *acridine orange* é de realização ainda mais fácil e rápida, por não ser necessário processamento do material biológico antes do preparo das lâminas e nem a fixação prévia à coloração. A facilidade para análise é também um ponto destacado por KISHI et al. (1992).

As principais vantagens da utilização do sangue periférico para a análise de micronúcleos foram apontadas por MACGREGOR et al. (1980) apud CSGMT (1992) como sendo o fato de que um mesmo animal pode fornecer várias amostras de material, sem a necessidade da eutanásia, a simplicidade da preparação das amostras e a abundância e uniformidade da população. Com a mesma confiabilidade que é utilizada para avaliar compostos mutagênicos, o teste de micronúcleo tem sido empregado para avaliar o potencial antimutagênico de vários compostos.

1.4.1.3 Danos no DNA Plasmidial

Os plasmídeos, encontrados em algumas bactérias e algumas espécies de eucariotos, são moléculas de DNA extras cromossômicas circulares ou lineares, com dupla fita, variando o seu tamanho de 2 a 50kb em média, entretanto, podem atingir até 500kb (FARAH, 2000; TRABULSI, 2004).

Os plasmídeos possuem replicação independente, ou seja, a sua duplicação não está ligada à duplicação do DNA cromossomal. Os genes que

desenvolvem funções essenciais não são encontrados no plasmídeo. Entretanto, podemos encontrar genes com algumas funções importantes como, os de resistência a antimicrobianos e metais pesados e a metabolização de alguns compostos importantes que permitem aos microrganismos possuidores de plasmídeo a sobreviver em condições adversas. Portanto, não é uma molécula indispensável ao microrganismo e sim, uma vantagem seletiva adquirida pelo mesmo (TRABULSI, 2004).

Devido à possibilidade de introduzi-lo com facilidade em bactérias, os plasmídeos são utilizados como vetores na engenharia genética por serem considerados ideais para transporte de material genético. Um dos plasmídeos mais comuns na engenharia genética é o pBR322, composto por 4.362pb, e dois genes de resistência aos antimicrobianos ampicilina e tetraciclina. Geralmente os plasmídeos podem carregar com sucesso moléculas de DNA de até 4.000pb (FARAH, 1997).

Por ser uma molécula de DNA relativamente pequena, o que facilita os trabalhos, os plasmídeos vêm sendo utilizados com sucesso na detecção de agentes genotóxicos.

Utilizando o plasmídeo PUC19, foi avaliada a capacidade protetora de biflavonóides extraídos de *Araucaria angustifolia* em proteger o DNA plasmidial contra danos oxidativos induzidos por NPDO₂ (1,4-naftalenodipropionato) e radiação ultravioleta (YAMAGUCHI et al., 2005).

Thomas et al. (1995) avaliaram a ação protetora de flavonóides contra o oxigênio molecular gerado por NPDO₂ no plasmídeo pBR322. Foi avaliado *in vitro*, utilizando plasmídeo, o potencial mutagênico e antimutagênico da quitina-glucana extraído do micélio do fungo *Aspergillus niger* contra a atividade mutagênica do H₂O₂. O referido composto mostrou atividade antimutagênica protegendo-a da ação do peróxido de hidrogênio (KOGAN et al., 2003).

Dantas et al. (1999) utilizaram o plasmídeo PUC 9.1 extraído de *Escherichia coli* para avaliar o potencial genotóxico de diferentes concentrações de cloreto de estanho frente ao DNA plasmidial. O cloreto de estanho promove quebras no DNA plasmidial o que muda a sua conformação e padrão de migração quando analisado no gel de agarose. Devido às quebras, o plasmídeo poderá apresentar as formas aberta e circular saindo de sua conformação original superenovelada. Estas mudanças de conformação são realizadas de acordo com o tipo de quebra que ocorreu, ou seja, quando temos uma quebra em uma fita simples do plasmídeo podemos observar a ocorrência da forma circular e quando ocorre dupla quebra pode-se observar que o plasmídeo assume a forma aberta.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

- Avaliar a mutagenicidade e antimutagenicidade dos extratos metaólico (MeOH) e clorofórmio (CHCl₃) de *Byrsonima basirolba*, CHCl₃ de *Byrsonima crassa* e CHCl₃ de *Davilla elliptica* e de sete substâncias isoladas destes extratos

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar para cada um dos extratos, a mutagenicidade e antimutagênicidade *in vitro* através do teste de Ames empregando-se as linhagens TA100, TA98, TA97a e TA102 de *Salmonella typhimurium* frente aos mutágenos o 4-o-nitrofenilenodiamina (NPD), Azida Sódica (AZS), Mitomicina (MC), Peróxido de Hidrogênio (H₂O₂), Benzo[a]pireno (B[a]P) e Aflatoxina B₁ (AFB₁).
- Avaliar a atividade mutagênica e antimutagênica *in vivo* dos extratos, empregando o teste do micronúcleo em células do sangue periférico de camundongos frente à ciclofosfamida.
- Avaliar, através do teste de Ames e de danos induzidos em DNA plasmidial, a mutagenicidade e antimutagenicidade das substâncias puras: Ácido gálico, Quercetina-3-o- α -L-raminopiranosídeo, Quercetina, Miricetina-3-o- α -L-raminopiranosídeo, Galato de metila, (+)catequina, Lupeol, obtidos dos diferentes extratos vegetais.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material vegetal

Todos os vegetais utilizados neste estudo tiveram como base principal os estudos realizados pelo Laboratório de Microbiologia da Profa. Dra. Clarice Queico F. Leite que desenvolveu estudos quanto ao potencial antimicobacteriano dos extratos citados abaixo. Estes ensaios fazem parte do projeto temático Biota-Fapesp, que está sendo desenvolvido de maneira conjunta por pesquisadores de diversas áreas de pesquisa pertencentes à Universidade de Campinas (UNICAMP), Universidade Estadual Paulista (UNESP) e a Universidade Estadual de Londrina (UEL), visando a identificação de compostos com várias atividades biológicas como: anti-inflamatória, antimicrobiana, antimicobacteriana, antioxidante e também quanto ao seu potencial mutagênico e antimutagênico.

As espécies utilizadas foram são espécies utilizadas pela população no combate a enfermidades. Portanto, neste trabalho utilizaram-se folhas das seguintes espécies vegetais: *Byrsonima basiloba*, *B. crassa* e *Davilla elliptica*.

Byrsonima basiloba foi coletada por Luís Fernando R. de Almeida (IBB-UNESP-Botucatu, SP) no município de Pratânia-SP., sendo identificada por Prof. Dr. José Clemente Campos do IB-Botucatu. A exsicata de número 24163 encontra-se depositada no herbário da UNESP- Botucatu.

Byrsonima crassa Niedenzu (IK) foi coletada por Eduardo Ribeiro dos Santos em Porto Nacional, no estado do TO, sendo posteriormente realizada a identificação pela Profª Solange de Fátima Lólis. As exsicatas foram depositadas no Herbário da Fundação Universidade do Tocantins com os seguintes números de voucher: *Byrsonima crassa* Niedenzu (IK), TO 3377.

Davilla elliptica A. St. -Hil foi coletada pela Profª Clélia A. Hiruma-Lima em Palmas (TO). Posteriormente a identificação foi realizada pela Profª Solange

de Fátima Lólis. A exsicata foi depositada no Herbário da Fundação Universidade do Tocantins com o seguinte número de *voucher*: *D.elliptica* St. Hil (Dilleniaceae) TO4593.

3.2 Obtenção de Extratos e substâncias

Os extratos e substâncias testados neste trabalho foram obtidos através do grupo do Prof. Dr. Wagner Vilegas do Instituto de Química (I.Q.) da UNESP Campus de Araraquara-SP. Foram testados os extratos clorofórmico (CHCl_3) apolares e metanólico (MeOH) polares.

O material vegetal coletado, foi levado a estufa para passar pelo processo de secagem a uma temperatura de aproximadamente 60 °C; após o período de secagem este material foi macerado em clorofórmio a fim de se obter o extrato clorofórmico, que decorrido 7 dias após a maceração inicial, passou por um processo de evaporação com temperatura de aproximadamente 40 °C, obtendo-se assim o extrato apolar, ou seja, extrato clorofórmico. Após o processo de evaporação e eluição do extrato clorofórmico, a sobra (torta) passou por uma nova maceração com metanol, de onde, após sete dias através do processo de evaporação a uma temperatura de aproximadamente 40 °C com pressão negativa, obteve-se o extrato polar, ou seja, extrato metanólico.

3.2.1 Obtenção de substâncias puras

Além dos extratos CHCl_3 e MeOH, foram testadas algumas substâncias puras: Ácido gálico, Quercetina-3-o- α -L-raminopiranosídeo, Quercetina, Miricetina-3-o- α -L-raminopiranosídeo, Galato de metila, (+)catequina e Lupeol que também foram

obtidas pelo grupo do Prof. Dr. Wagner Vilegas. Os procedimentos utilizados para isolamento dessas substâncias estão descritos em Rodrigues, et al., (2007).

3.3 Concentrações utilizadas

3.3.1 Extratos

Para o desenvolvimento do ensaio de mutagenicidade e antimutagenicidade *in vitro* (teste de Ames) foram utilizadas cinco concentrações diferentes para cada extrato, que foram determinadas a partir do ponto máximo de solubilidade, diluídos em DMSO.

Para o ensaio *in vivo* (teste de micronúcleos) de mutagenicidade e antimutagenicidade, utilizaram-se três diferentes concentrações correspondendo a 100%, 75% e 50% da concentração máxima de solubilidade. Os extratos foram solubilizados em óleo de soja da marca *Soya* e administrados aos animais via *gavage* num volume máximo de 0,3mL/animal.

3.3.2.Substâncias puras

Para as substâncias isoladas as concentrações das soluções utilizadas no teste da indução de danos no DNA plasmidial foram de 0,45 mg/mL e 0,9 mg/mL. No teste de Ames foram avaliadas na concentração de 75µg/placa.

3.4 Avaliação da antimutagenicidade e mutagenicidade

Para realização do estudo de potencial mutagênico e antimutagênico *in vitro*, dos extratos de *B. crassa*, *B. basiloba* e *D. elliptica*, foram empregados o teste de Ames com *Salmonella typhimurium* linhagens TA100, TA102, TA98 e TA97a, com e sem ativação metabólica .

Para avaliação do potencial mutagênico e antimutagênico *in vivo* foi empregado o teste do micronúcleo em sangue periférico de camundongos.

3.4.1 Teste de Ames

O ensaio utilizado para detectar mutação gênica reversa foi o Teste de Ames que se baseia no emprego de linhagens de *Salmonella typhimurium* auxotróficas para o aminoácido histidina, as quais reverterem à prototrofia pelo tratamento com agentes mutagênicos (MARON e AMES,1983).

3.4.1.1 Linhagens utilizadas

Foram utilizadas as linhagens TA100, TA97a, TA98 e TA102 de *Salmonella typhimurium*, gentilmente cedidas pelo Dr. Bruce Ames da Universidade de Berkeley, Califórnia. A linhagem TA100 detecta mutágenos que causam substituição de pares de bases no DNA, contém uma mutação no gene *HisG* (*HisG46*) que codifica para a primeira enzima da biossíntese da histidina, tendo o par GC como ponto preferencial para a reversão. Na linhagem TA97a pode ser detectada a mutação de deslocamento de quadro de leitura onde o alvo das mutações são sítios de CG, esta linhagem apresenta a mutação *HisD6610*. A cepa TA98 apresenta mutação no gene *HisD* (*HisD3052*) que codifica para a histidinol desidrogenase, apresentando como ponto preferencial para a reversão oito resíduos repetitivos de GC e detecta compostos mutagênicos que causam deslocamento do quadro de leitura do DNA. A TA102 é capaz de detectar uma

variedade de mutágenos, principalmente agentes oxidantes, essa linhagem contém uma mutação ocre-TAA no *gene HisG*.

3.4.1.2 Manutenção e estoque das cepas de *Salmonella typhimurium*

As cepas de *S. typhimurium* ficaram estocadas em tubos para congelamento (1,5mL), e mantidas à -70°C para que se mantivessem inalteradas todas as suas características genéticas. Para cada 0,9mL de cultura, foi adicionado 0,1mL de dimetilsufóxido (DMSO) que é um crioprotetor.

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

As características genéticas das cepas de *S. typhimurium* foram checadas rotineiramente, antes do preparo dos estoques para congelamento. A dependência da histidina, presença de mutação *rfa*, presença de deleção *uvrB* e a presença de plasmídios de resistência também foram verificadas.

3.4.1.4 Taxa de reversão espontânea

A reversão espontânea das cepas-teste para independência à histidina foi medida rotineiramente sendo que a frequência de reversão é característica para cada cepa. As colônias revertentes prototróficas para a histidina, são facilmente visíveis em placas de ágar mínimo glicosado com traços de histidina e biotina, em contraste com as colônias auxotróficas, que formaram uma fina camada de crescimento bacteriano ('background').

3.4.1.5 Preparo do inóculo de *S. typhimurium* utilizados no ensaio

Semeou-se com auxílio de alça de inoculação, pequena quantidade do crescimento da cultura em 30 mL de caldo nutriente (Oxoid n. 2). Incubou-se a 37°C por 12-16 horas em banho-maria com agitação (160 rpm) de modo a obter uma densidade de $1,2 \times 10^9$ bactérias/mL. Após crescimento manteve-se a cultura sob refrigeração durante o período que a mesma não estava sendo utilizada.

3.4.1.6 Controles

Os controles negativos foram feitos com o solvente dos extratos, ou seja, com o DMSO. Além disso, foram utilizados mutágenos diretos e indiretos conhecidos que atuaram como agentes indutores das mutações. Em ausência de metabolização, utilizou-se para as linhagens TA98 e TA97a o 4-o-nitrofenilenodiamina (NPD), para a TA100 a azida Sódica (AZS) e para a linhagem TA102 a mitomicina (MC) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Para os ensaios com ativação metabólica foram utilizados o benzo[a]pireno (B[a]P) e aflatoxina B₁ (AFB₁) para as linhagens TA97a, TA98 e TA100 e para a TA 102 o peróxido de hidrogênio.

3.4.1.7 Ensaios de mutagenicidade

De acordo com a metodologia de pré-incubação, desenvolvida por Maron e Ames (1983), diferentes concentrações dos extratos vegetais foram misturadas a 0,5 mL de tampão fosfato 0,2M pH 7,4, 0,1 mL de cultura de bactérias e incubadas de 20-30 minutos a 37°C. Nos ensaios com ativação metabólica, foram adicionados, em substituição ao tampão fosfato, 0,5 mL da mistura S9. Decorrido o tempo de incubação, 2 mL de “top ágar” (agar de superfície), contendo traços de L-histidina e D-biotina,

foram adicionados a mistura presente nos tubos. O conteúdo de cada tubo, assim composto, foi levemente homogeneizado em vórtex e vertido sobre a superfície de uma placa contendo ágar mínimo glicosado. Após solidificação do “top-ágar”, as placas foram incubadas por 48 horas, a 37°C. Ao término desse período, foi realizada a contagem do número de colônias revertentes por placa. Os ensaios foram realizados em triplicata.

3.4.1.8 Ensaios de antimutagenicidade

Foram utilizadas diferentes concentrações dos extratos: sendo: 0,46; 0,91; 1,83; 3,65; 7,3; 14,6 e 21,9 mg/placa para o extrato metanólico (MeOH) de *B. basiloba*; 0,99; 1,99; 3,97; 7,95 e 15,9mg/placa do extrato clorofórmico (CHCl₃) de *B. basiloba*; 0,74; 1,48; 2,97; 5,95 e 8,95 mg/placa do extrato CHCl₃ de *B. crassa*.; 1,04; 2,08; 4,17; 8,35 e 12,525 mg/placa do extrato CHCl₃ de *D. ellyptica*.

Também foi empregada a metodologia de pré-incubação em placas, desenvolvida por Maron e Ames (1983) sendo que, neste ensaio os extratos foram misturados a 0,1mL de cultura de bactérias, um agente mutagênico (azida sódica, 4-o-nitro-fenilenodiamina, mitomicina C, peróxido de hidrogênio, benzo[a]pireno ou aflatoxina B₁) e a fração S9 dependendo do mutágeno usado. Em seguida o conteúdo de cada tubo assim composto foi levado a estufa a 37 °C por um período de 20-30 minutos. Decorrido este tempo, a essa mistura foram adicionados 2mL de ágar superfície (“top agar”) suplementado com traços de histidina e biotina, depois foi levemente homogeneizado e vertido sobre a superfície de uma placa contendo ágar mínimo glicosado. Após solidificação do “top-ágar”, as placas foram incubadas por 48 horas a 37 °C. Após esse tempo procedeu-se a contagem do número de colônias revertentes por placa. Todo o ensaio foi realizado em triplicata. O cálculo da porcentagem da inibição da mutagenicidade foi realizado de acordo com Tachino et al. (1994) onde:

$$\text{Inibição} = 1 - \frac{\text{revertentes induzidos/placa (com inibidor)}}{\text{revertentes induzidos/placa (sem inibidor)}} \times 100$$

3.4.1.9 Teste de viabilidade

O teste de viabilidade foi aplicado para todas as concentrações que apresentaram índice de inibição da mutagenicidade acima de 40% (BUKOVA, 2005). Para o desenvolvimento do teste de viabilidade procedeu-se da mesma maneira para o método de pré-incubação em placas, ou seja, misturou-se num tubo de ensaio o mutágeno, a bactéria, o tampão (ou S9) e a amostra a ser testada. Após homogeneizar em vortex, o conteúdo de cada tubo foi adicionado em tubos com 9mL de solução fisiológica estéril a fim de se obter uma diluição de 1:10 e em seguida homogeneizado e 1mL transferido para outro tubo com mesma quantidade de solução fisiológica e este procedimento foi repetido até obter-se uma diluição de 10^{-5} . Do tubo contendo a diluição de 10^{-5} retirou-se 0,1mL e semeou-se com alça de Drigalsky em placas com ágar nutriente, em seguida encubou-se por 24h a 37 °C. Decorrido este período, as colônias foram contadas e calculadas as unidades formadoras de colônias/mL (UFC= diluição X nº de colônias X 10). O percentual de viabilidade para cada tratamento foi comparado com o número de colônias do controle negativo.

De acordo com Vargas et al. (1993) foram consideradas citotóxicas as amostras que apresentaram um percentual de viabilidade menor que 60%.

3.5 TESTE DO MICRONÚCLEO

3.5.1 Animais

Foram utilizados camundongos da espécie *Mus musculus* (Swiss albino) com aproximadamente 30g de peso corpóreo, provenientes do Biotério Central do

Centro de Ciências Biológicas da UNESP de Botucatu-SP. Os animais foram mantidos em caixas individuais de polipropileno, com tampa-grade, durante o período de tratamento, com água e alimento *ad libitum*, ciclo claro/escuro de 12 horas e temperatura de 23 ± 2 °C. O projeto de pesquisa para o desenvolvimento desse trabalho foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Franca UNIFRAN-Franca –SP, sendo toda a metodologia de experimentação com animais aprovada.

Para os tratamentos os animais foram divididos em grupos de 6, sendo 3 machos e 3 fêmeas. Cada um deles recebeu as diferentes doses dos extratos vegetais via *gavage*, num volume máximo de 0,1 mL para cada 10g de peso corpóreo.

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

3.5.2 Preparo das lâminas com Acridine Orange

As lâminas (bem limpas) foram aquecidas em uma placa aquecedora a aproximadamente 70 °C. Sobre as lâminas quentes, foram colocados 10µl de solução de acridine orange (1mg/mL) e fazendo-se o espalhamento utilizando a extremidade de outra lâmina bem limpa. As lâminas foram secas ao ar protegida da luz e em seguida guardadas em caixa apropriada, a temperatura ambiente, em local escuro, por pelo menos 24h.

3.5.3 Obtenção do sangue e preparo das células

Com o auxílio de uma agulha, a cauda dos animais foi perfurada, coletando-se 5µL de sangue (uma gota) e depositando-os no centro da lâmina previamente preparada com acridine orange, cobrindo-a com lamínula. As lâminas com

o material biológico foram mantidas a -20 °C, no escuro, por no mínimo 24 horas antes da análise citológica, propiciando uma melhor ação do corante.

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

3.5.4 Ensaio de antimutagenicidade

Para avaliação da antimutagenicidade *in vivo* dos extratos obtidos das plantas medicinais nativas do Bioma Cerrado, foram utilizadas três doses de cada um dos extratos vegetais: CHCl₃ de *B. crassa*, CHCl₃ de *D. ellyptica*, CHCl₃ e MeOH de *B. basiloba* que foram administradas aos animais via *gavage*.

Para diluição dos extratos utilizou-se óleo de soja da marca Soya como solvente. (controle negativo). O agente mutagênico utilizado foi a ciclofosfamida administrada intraperitonealmente na concentração de 50mg/kg p.c.

Foram estabelecidos os seguintes grupos experimentais:

- 1- Controle solvente: este grupo foi tratado com 0,3mL de óleo de soja
- 2- Controle positivo: todos os animais deste grupo foram tratados via intraperitoneal com 0,3mL de ciclofosfamida na dosagem de 50 mg/kg p.c.
- 3- Controle positivo associado ao solvente: os animais deste grupo receberam via *gavage* 0,3mL de óleo de soja e via intraperitoneal 0,3mL de ciclofosfamida (50 mg/kg p.c.)
- 4- Tratamento com extrato MeOH de *B. basiloba* via *gavage* nas dosagens: 166, 124,5 e 83mg/mL + ciclofosfamida (50 mg/kg p.c.)

5- Tratamento com extrato CHCl_3 de *B. basiloba* via *gavage* nas concentrações: 100, 75 e 50mg/mL + ciclofosfamida (50 mg/kg p.c.).

6- Tratamento com extrato CHCl_3 de *B. crassa* administrado via *gavage* nas concentrações de 125, 93,75 e 62,5mg/mL + ciclofosfamida (50 mg/kg p.c.).

7- Tratamento com extrato CHCl_3 de *D. elliptica* nas concentrações de 111, 93,7 e 62,5 mg/mL + ciclofosfamida (50 mg/kg p.c.).

8- Controle sem nenhum tratamento.

Foram coletadas amostras de sangue da cauda dos animais trinta horas depois da administração dos compostos-testes.

3.5.5 Ensaio de mutagenicidade

O teste para verificar a mutagênicidade dos extratos foi utilizado apenas a maior concentração utilizada para os ensaios de antimutagenicidade.

Foram formados além dos grupos controles positivo e negativo, os grupos com

1- Controle solvente: este grupo foi tratado com 0,3mL de óleo de soja

2- Controle positivo: todos os animais deste grupo foram tratados via intraperitoneal com 0,3mL de ciclofosfamida na dosagem de 50 mg/kg p.c.

3- Controle positivo associado ao solvente: os animais deste grupo receberam via *gavage* 0,3mL de óleo de soja e via intraperitoneal 0,3mL de ciclofosfamida (50 mg/kg p.c.)

4- Tratamento com extrato MeOH de *B. basiloba* via *gavage* na dosagem de 166 mg/mL.

5- Tratamento com extrato CHCl_3 de *B. basiloba* via *gavage* nas concentrações de 100mg/mL.

6- Tratamento com extrato CHCl_3 de *B. crassa* administrado via *gavage* nas concentrações de 125mg/mL.

7- Tratamento com extrato CHCl_3 de *D. elliptica* nas concentrações de 111mg/mL.

8- Controle sem nenhum tratamento.

Foram coletadas amostras de sangue da cauda dos animais trinta horas depois da administração dos compostos-testes.

3.5.6 Análise Estatística dos Resultados

Após a análise citológica das lâminas contendo amostras do sangue periférico dos camundongos, foram calculadas as frequências médias de células micronucleadas, bem como os desvios padrões para cada um dos grupos de tratamento. A partir destes resultados foi aplicado o teste-*t* de Student, realizando-se comparações entre os valores obtidos para os grupos tratados com os extratos vegetais + controle positivo e aqueles obtidos a partir do grupo controle positivo. Os testes estatísticos foram realizados com o software estatístico INSTAT (GraphPad).

O teste-*t* é utilizado quando se faz a comparação entre as médias obtidas de duas amostras, com variâncias iguais. Nesse teste a hipótese nula (H_0) considera que não existem diferenças estatísticas entre as amostras e a hipótese alternativa é que as médias apresentam diferenças entre si.

3.6 Teste do plasmídeo

Para avaliação do potencial indutor ou protetor dos danos ao DNA induzidos pelas substâncias puras encontradas nos extratos polares e apolares foi utilizado o teste com plasmídeos isolados de *Escherichia coli* DH5SαFIQ. O plasmídeo utilizado foi o pUC9.1 que confere resistência ao antimicrobianos ampicilina e canamicina. Esta linhagem foi gentilmente cedida pelo laboratório do Dr. Adriano Caldeira Araújo do Departamento de Biofísica, do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ).

3.6.1 Procedimento

Foi selecionada uma colônia bem isolada no meio de cultura Lauria-Bertani (LB) sólido, em seguida repicada em LB líquido com antibióticos 50µg/mL de canamicina e 10µg/mL de ampicilina e incubado overnight, sob agitação. Decorrido o tempo de aproximadamente 12 horas, foi avaliado o crescimento da cultura utilizando-se espectrofotômetro, com absorbância de 1,5 a 2,5 em 600nm o que indica bom crescimento bacteriano e boa probabilidade de obter número elevado de cópias de DNA plasmidial.

3.6.2 Isolamento do plasmídeo

Para isolar o DNA plasmidial foi utilizado o kit de extração Perfectprep Plasmidi Mini da Ependorf.

3.6.3 Quantificação do DNA plasmidial extraído

Após a realização da extração conforme instruções do fabricante do kit referido anteriormente o DNA plasmidial foi quantificado por espectrofotômetro com a leitura sendo realizada em 260 nm de onda de absorção.

Para realizar esta quantificação foi adicionado a um microtubo 1,5µl da amostra completando com água para um volume final de 500 µl, em seguida procedeu-se a leitura.

A concentração de DNA é dada pela multiplicação da concentração obtida na leitura vezes o volume. Ou seja,
$$C = \frac{m}{v}$$

Sendo que a concentração final de DNA na amostra é obtida utilizando a formula [] µg/mL= Abs 260 X diluição X fator de correção (DNA = 50).

3.6.4 Tratamento do DNA plasmidial

Para o tratamento dos plasmídeos foram feitas alíquotas de aproximadamente 200ng de DNA por tubo, em seguida foi realizado o tratamento descrito a seguir.

Em um microtubo adicionou-se: 5 µL DNA + 45 µL água milli-Q; mantendo sempre o volume final da reação em 50 µL. Incubou-se a temperatura ambiente, por aproximadamente 40 minutos.

Controle positivo: 5 µL DNA + 45 da solução de cloreto de estanho (CE) 200 µg/mL (possibilita visualização das formas círculo aberto e linear).

Para avaliação das substâncias isoladas, foi adicionado em um microtubo 5 µL DNA + 45 µL da solução substância a ser testada (0,9mg/ml e 0,45mg/ml). Da mesma maneira incubou-se por aproximadamente 40 minutos à temperatura ambiente, realizando em seguida a avaliação através da eletroforese em gel de agarose.

Na avaliação do potencial protetor das substâncias contra os danos induzidos pelo CE procedeu-se da mesma maneira descrita anteriormente para avaliação do potencial indutor de danos, sendo que, no microtubo foram misturados o DNA , o CE e a substância que se queria avaliar.

3.6.5 Análise dos resultados

Após o período de incubação, uma alíquota de aproximadamente 10µl de cada microtubo com tratamentos diferenciados foi submetida a um gel de eletroforese com concentração de 0,8% de agarose para verificar a estrutura do plasmídeo PUC 9.1 após o tratamento com o controle positivo (CE) e as substâncias avaliadas. Neste gel é possível observar as três conformações apresentadas pelo plasmídeo, ou seja, círculo aberto resultante de uma quebra simples, forma linear resultante de quebras dupla ou a forma nativa superenovelada quando não sofre quebras.

O gel foi analisado utilizando o Software de bioinformática *Alphaimager* da empresa Alphainnotech. Que compara a intensidade das bandas pela quantidade em pixels.

4.RESULTADOS

Para avaliar o potencial mutagênico e antimutagênico dos extratos CHCl_3 e MeOH de *B. basiloba*, CHCl_3 de *B. crassa* e CHCl_3 de *D. elliptica*, foram utilizados: os testes de Ames, de micronúcleo e do plasmídeo. Os resultados observados para os diferentes extratos estão apresentados nas Tabelas e Figuras a seguir.

4.1 Teste de Ames

4.1.1 *Byrsonima basiloba*

Os extratos metanólico e clorofórmico de *B. basiloba* quando avaliados através do teste de Ames nas linhagens TA97a, TA98, TA100 e TA102 de *S.typhimurium* não apresentaram mutagenicidade (LIRA, et al. 2007 in press- anexo 1)

Extrato MeOH de *B.basiloba*

Antimutagenicidade

Os resultados obtidos na avaliação da atividade antimutagênica do extrato MeOH de *B. basiloba* estão demonstrados nas Tabelas 1 e 2, e Figuras 6, 7, e 8.

Para a linhagem TA97a foi observada a redução do número de colônias revertentes, porém, de acordo com os ensaios de viabilidade, essa redução foi devido ao efeito tóxico dos agentes utilizados. Portanto, em nenhuma das condições testadas (presença ou ausência de metabolização) o extrato MeOH de *B. basiloba* desenvolveu efeito antimutagênico. para a

Quando o extrato MeOH de *B.basiloba* foi testado na linhagem TA98 contra mutágenos diretos ou indiretos pode-se constatar redução em torno de 80% no número de colônias revertentes como mostrado na Figura 6.

Na linhagem TA100 o extrato MeOH de *B. basiloba* não apresentou redução no número de colônias revertentes frente a AZS. O mesmo extrato foi testado contra mutágenos indiretos, e apresentou redução frente ao efeito da AFB_1 (Tabela 2,

Figura 7). Entretanto, foi citotóxico nas duas maiores concentrações testadas e quando avaliado em relação ao B[a]P, também se verificou efeito citotóxico (Tabela 2).

Nos testes realizados sem ativação metabólica com a linhagem TA102 (Tabela 1 Figura 8), também foi possível observar uma redução significativa no número de colônias revertentes nas duas maiores concentrações mostrando o efeito protetor do extrato MeOH de *B.basiloba*, contra o efeito da MC (Figura 8). Frente ao H₂O₂ sem ativação metabólica, o extrato apresentou índice de redução significativo no número de colônias revertentes, nas concentrações de 3,65 e 7,30mg/placa. Nas três maiores concentrações observaram-se efeitos citotóxico (Tabela 2), mas, com +S9, a redução foi observada apenas nas duas menores concentrações (Tabela 2).

Tabela 1. Atividade antimutagênica expressa pela média, desvio padrão do número de revertentes e percentual de inibição (valor entre parênteses) do extrato MeOH de *B. basiloba* frente a compostos mutagênicos diretos, utilizando as linhagens TA97a, TA98, TA100 e TA102 de *S. typhimurium*.

Linhagens	Mutágenos	Concentração do extrato (mg/placa)				
		Número de revertentes (% inibição)				
NPD						
		1,82	3,65	7,30	14,60	21,90
TA97a	810±30	318±80 (tox)	335±9 (tox)	94±30 (tox)	45±8 (tox)	22±3 (tox)
TA98	504±9	341±31 (32)	340±39 (32)	327±17 (35)	286±37 (43)*	96±20 (80)*
AZS						
TA100	2373±90	1770±130 (25)	2016±194 (15)	2074±12 (12)	1366±145 (tox)	495±130 (tox)
MC						
TA102	1737±77	1507±7 (13)	1558±85 (10)	1265±24 (27)	605±88 (65)*	620±167 (64)*
H ₂ O ₂						
TA102	503±11	332±15 (34)	235±75 (53)*	242±52 (52)*	78±3 (tox)	67±2 (tox)

NPD (4-nitro-o-phenilenediamina – 10,0 µg/placa); AZS= Azida Sódica (1,25 µg/placa); MC = Mitomicina C (0,5µg/placa); H₂O₂ (Peróxido de hidrogênio - 0,034mg/placa); MeOH – Extrato Metanólico. Tox= viabilidade < 60%; *=antimutagênico.

Tabela 2. Atividade antimutagênica expressa pela média, desvio padrão do número de revertentes e percentual de inibição (valor entre parênteses) do extrato MeOH de *B. basiloba* frente a compostos mutagênicos indiretos, utilizando as linhagens TA97a, TA98, TA100 e TA102 de *S. typhimurium*.

mutagênicos indiretos, utilizando as linhagens TA97a, TA98, TA100 e TA102 de <i>S. typhimurium</i> .						
Linhagens	Mutágenos	Concentração do extrato (mg/placa)				
		Numero de revertentes M±SD				
		(% inibição)				
AFB ₁						
		0,46	0,91	1,83	3,65	7,30
TA97a	1182±45	276±12	217±10	245±12	209±1.5	199±25
		(tox)	(tox)	(tox)	(tox)	(tox)
		1,82	3,65	7,30	14,60	21,90
TA98	613±16	199±24	164±14	194±13	145±16	119±17
		(68)*	(73)*	(68)*	(76)*	(81)*
TA100	1627±77	254±16	228±12	179±8	128±16	117±17
		(84)*	(86)*	(89)*	(tox)	(tox)
B[a]P						
		0,46	0,91	1,83	3,65	7,30
TA97a	749±6	187±63	210±13	193±16	191±15	144±42
		(tox)	(tox)	(tox)	(tox)	(tox)
		1,82	3,65	7,30	14,60	2190
TA98	595±1	201±8	169±12	163±8	163±10	110±9
		(66)*	(72)*	(73)*	(73)*	(82)*
TA100	710±22	95±3	96±11	86±7	53±3	13±2
		(tox)	(tox)	(tox)	(tox)	(tox)
H ₂ O ₂						
TA102	614±18	200±8	222±11	188±32	133±32	61±28
		(68)*	(64)*	(tox)	(tox)	(tox)

H₂O₂= Peróxido de hidrogênio (0,034mg/placa); AFB₁ =Aflatoxina B₁ (0,5µg/placa), B[a]P = Benzo[a]apireno (1µg/placa); MeOH – Extrato Metanólico. Tox= viability < 60%; *= antimutagênico.

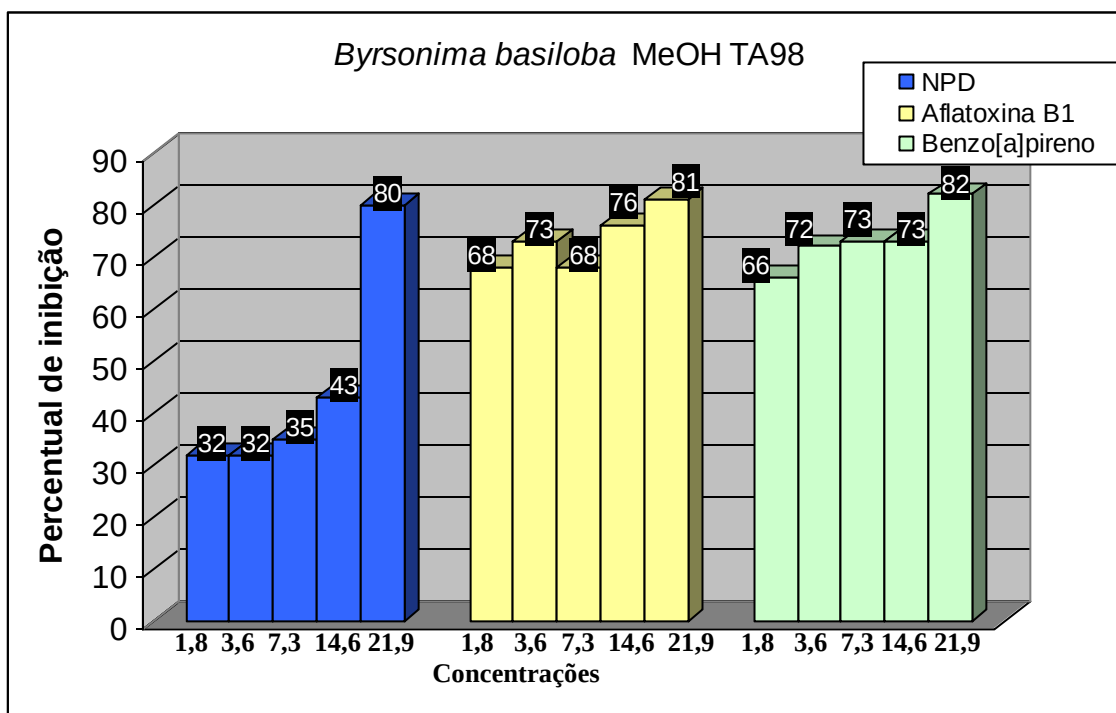


Figura 6: Percentual de inibição do extrato MeOH de *B. basiloba* quando testado com a linhagem TA98; NPD (4-nitro-o-phenilenediamina – 10,0 µg/placa); Aflatoxina B1 (0,5µg/placa), Benzo[a]pireno (1µg/placa); MeOH – Extrato Metanólico.

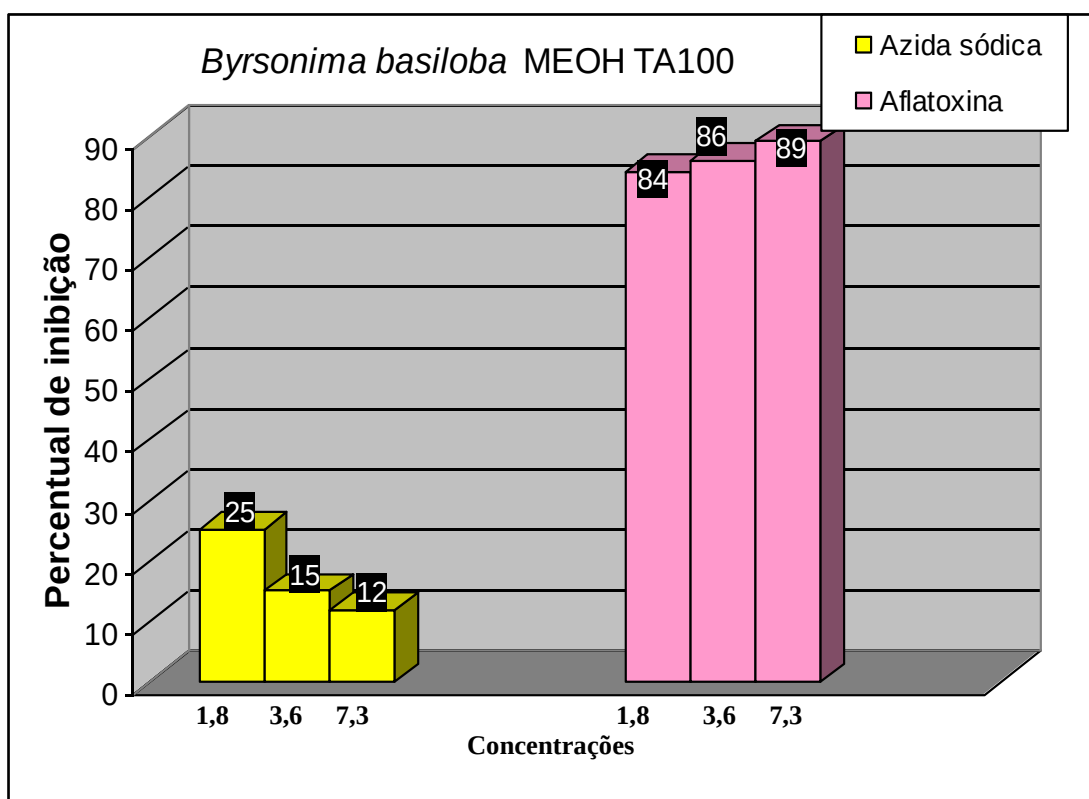


Figura 7: Percentual de inibição do extrato MeOH de *B. basiloba* quando testado com a linhagem TA100. Aflatoxina B1 (0,5µg/placa), Azida Sódica (1,25 µg/placa); MeOH – Extrato Metanólico.

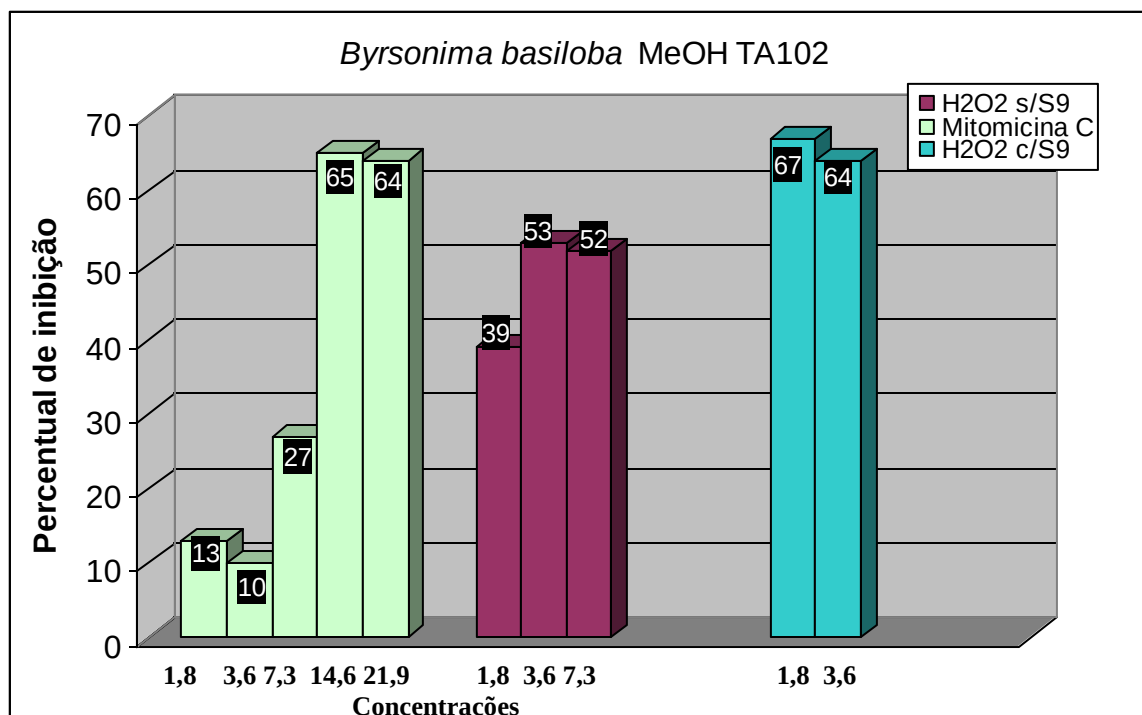


Figura 8: Percentual de inibição do extrato MeOH de *B. basiloba* quando testado com a linhagem TA102. Mitomicina C (0,5 µg/placa); Peróxido de Hidrogênio (0,034mg/placa); MeOH – Extrato Metanólico.

Estudo fitoquímico do Extrato

De acordo com o estudo fitoquímico realizado foram encontradas as substâncias apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3. perfil fitoquímico do extrato MeOH de *B. basiloba*

Quercetina-3-O- α -L-raminopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)-O-[α -L-raminopiranosil-(1 $\rightarrow$ 6)]- β -D-allopiranosídeo
Quercetina-3-O- α -L-raminopiranosídeo
Amentoflavona
(+)-catequina
(-)-epicatequina
Galato de metila
Quercetina-3-O- β -D-Galactopiranosídeo
Lupeol
Ácido ursólico
Ácido olenólico
(+)-catequina,
Ácido gálico

Dados cedidos pela equipe do Dr. Wagner Vilegas.

Extrato CHCl₃ de Byrsonima basiloba

Antimutagenicidade

Os resultados do extrato CHCl₃ de *B. basiloba* estão demonstrados nas Tabelas 4 e 5 e os índices de inibição da mutagenicidade nas Figuras de 9 a 12.

A avaliação dos dados da linhagem TA97a em relação ao extrato CHCl₃ de *B. basiloba* sem ativação metabólica mostrou que houve uma redução significativa no número de mutantes revertentes para todas as concentrações testadas (Tabela 4). Quando avaliado com ativação metabólica na mesma linhagem também se mostrou efetivo na redução no número de colônias revertentes frente ao B[a]P, sendo tóxico quando testado em conjunto com a AFB₁ (Tabela 5). A Figura 9 ilustra os índices de inibição obtidos para essa linhagem.

Da mesma forma, os dados da avaliação do extrato na linhagem TA98, também mostraram que houve uma redução significativa para as duas maiores concentrações testadas contra os mutágenos diretos (Tabela 4) e indiretos (Tabela 5). Na Figura 10 estão os índices de inibição.

Na linhagem TA100 o extrato CHCl₃ de *B. basiloba* apresentou redução de maneira significativa no número de colônias revertentes nas duas maiores concentrações testadas frente a AZS azida sódica (Tabela 5, Figura 11). Já para o teste com mutágenos indiretos, o extrato CHCl₃ de *B. basiloba* não foi capaz de reduzir o número de colônias revertentes induzidas pelo B[a]P e a AFB₁ para as concentrações testadas (Tabela 5).

Com a linhagem TA102 também foi possível observar uma redução significativa no número de colônias revertentes em três concentrações, quando testado frente a MC. Quando se utilizou peróxido de hidrogênio (H₂O₂), de forma direta, apenas a maior concentração utilizada foi capaz de promover redução (Tabela 4, Figura 12). Já quando testado contra o H₂O₂ com metabolização o extrato promoveu redução em todas as concentrações utilizadas (Tabela 5, Figura 12).

Tabela 4. Atividade antimutagênica expressa pela média, desvio padrão do número de revertentes e percentual de inibição (valor entre parênteses) do extrato CHCl₃ de *B. basiloba* frente a compostos mutagênicos –S9, utilizando as linhagens TA97a, TA98, TA100 e TA102 de *S. typhimurium*.

Linhagens	Mutágenos	Concentração do extrato (mg/placa)				
		Número de revertentes M±SD (% inibição)				
NPD						
TA97a		0,99	1,99	3,97	7,95	15,90
	810±30	203±46 (74)	197±20 (76)	178±17 (78)	179±16 (78)	193±10 (76)
TA98						
	504±9	341±31 (32)	340±39 (33)	327±17 (35)	286±37 (43)*	196±20 (61)*
AZS						
TA100						
	2373±90	1770±130 (25)	2016±194 (15)	2074±12 (12)	1366±145 (44)*	495±130 (79)*
MC						
TA102						
	1731±77	1724±182 (0,4)	1182±122 (32)	783±61 (55)*	578±16 (67)*	585±84 (66)*
H ₂ O ₂						
TA102		0,99	1,99	3,97	7,95	15,9
	503±11	418±29 (17)	493±56 (2)	418±26 (17)	392±13 (22)	270±28 (46)*

NPD (4-nitro-*o*-phenilenediamina – 10,0 µg/placa); AZS= Azida Sódica (1,25 µg/placa); MC= Mitomicina C (0,5 µg/placa); (H₂O₂) Peróxido de hidrogênio (0,034mg/placa); CHCl₃ – Extrato Cloroformico. Tox= viabilidade < 60%; *= antimutagênico.

Tabela 5. Atividade antimutagênica expressa pela média, desvio padrão do número de revertentes e percentual de inibição (valor entre parênteses) do extrato CHCl₃ de *B. basiloba* frente a compostos mutagênicos +S9, utilizando as linhagens TA97a, TA98, TA100 de *S. typhimurium*.

Linhagens	Mutágenos	Concentração do extrato (mg/placa)				
		Número de revertentes M±SD (% inibição)				
B[a]P						
		0,99	1,99	3,97	7,95	15,90
TA97a	749±	676±10 (10)	289±14 (61)*	164±14 (78)*	178±9 (76)*	165±13 (78)*
TA98	595±1	259±11 (56)*	212±4 (64)*	208±13 (65)*	258±13 (56)*	197±9 (66)*
TA100	710±22	350±15 (tox)	253±16 (tox)	85±16 (tox)	74±11 (tox)	23±2.3 (tox)
AFB ₁						
TA97a	1128±45	276±12 (tox)	217±10 (tox)	245±12 (tox)	209±1.5 (tox)	199±2.5 (tox)
TA98	613±16	211±2 (65)*	183±18 (70)*	186±7 (69)*	179±4 (70)*	158±4 (74)*
TA100	1627±75	223±16 (tox)	169±16 (tox)	121±19 (tox)	194±84 (tox)	134±9 (tox)
H ₂ O ₂						
TA102	614±18	254±18 (59)*	269±31 (56)*	267±6 (57)*	234±13 (62)*	261±24 (58)*

H₂O₂=Peróxido de hidrogênio (0,034mg/placa); AFB₁=Aflatoxina B1 (0,5µg/placa), B[a]P= Benzo[a]pireno (1µg/placa); CHCl₃– Extrato Clorofórmico. Tox= viability < 60%; *= antimutagênico

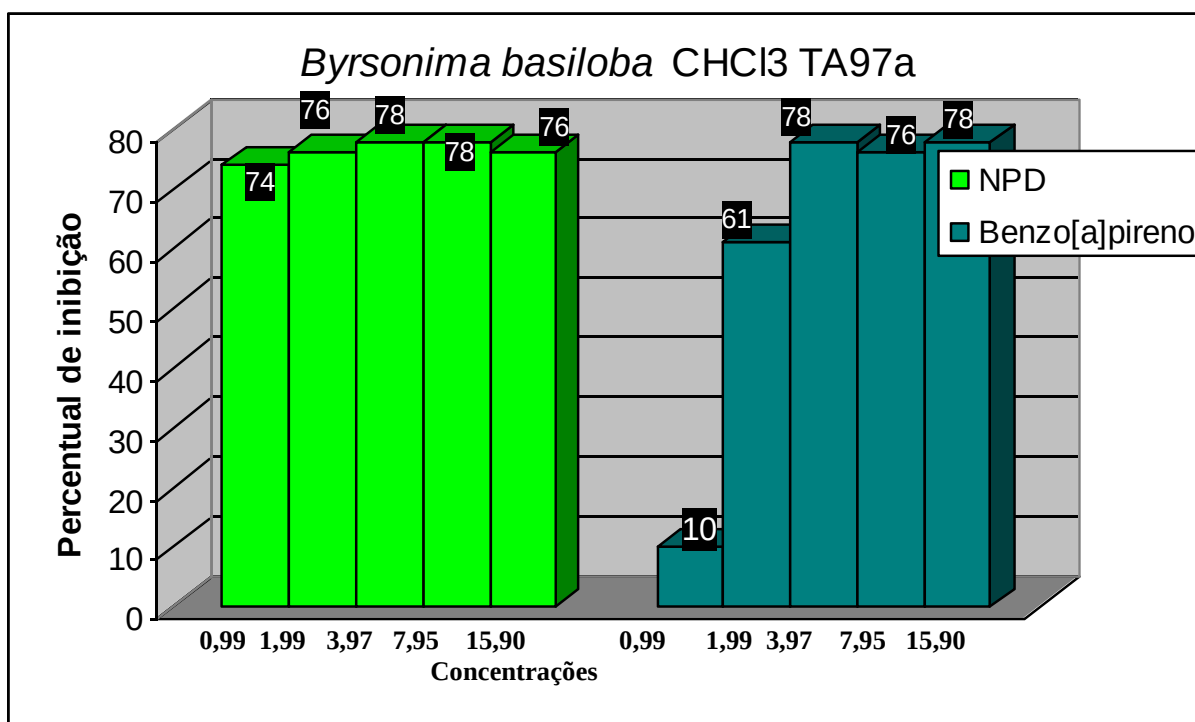


Figura 9: Percentual de inibição do extrato CHCl₃ de *B. basiloba* quando testado com a linhagem TA97a. NPD (4-nitro-*o*-phenilenediamina – 10,0 µg/placa); Benzo[a]pireno (1µg/placa); CHCl₃ – Extrato clorofórmico.

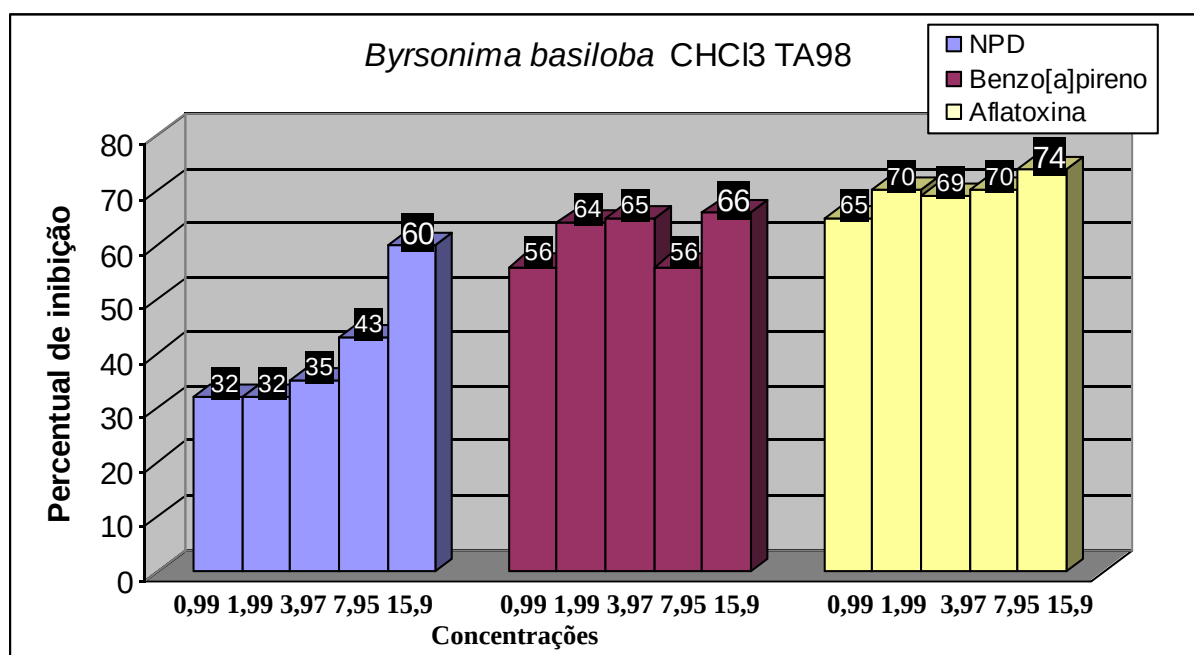


Figura 10: Percentual de inibição do extrato CHCl₃ de *B. basiloba* quando testado com a linhagem TA98; NPD (4-nitro-*o*-phenilenediamina – 10,0 µg/placa); Aflatoxina B₁ (0,5µg/placa), Benzo[a]pireno (1µg/placa); CHCl₃ – Extrato clorofórmico.

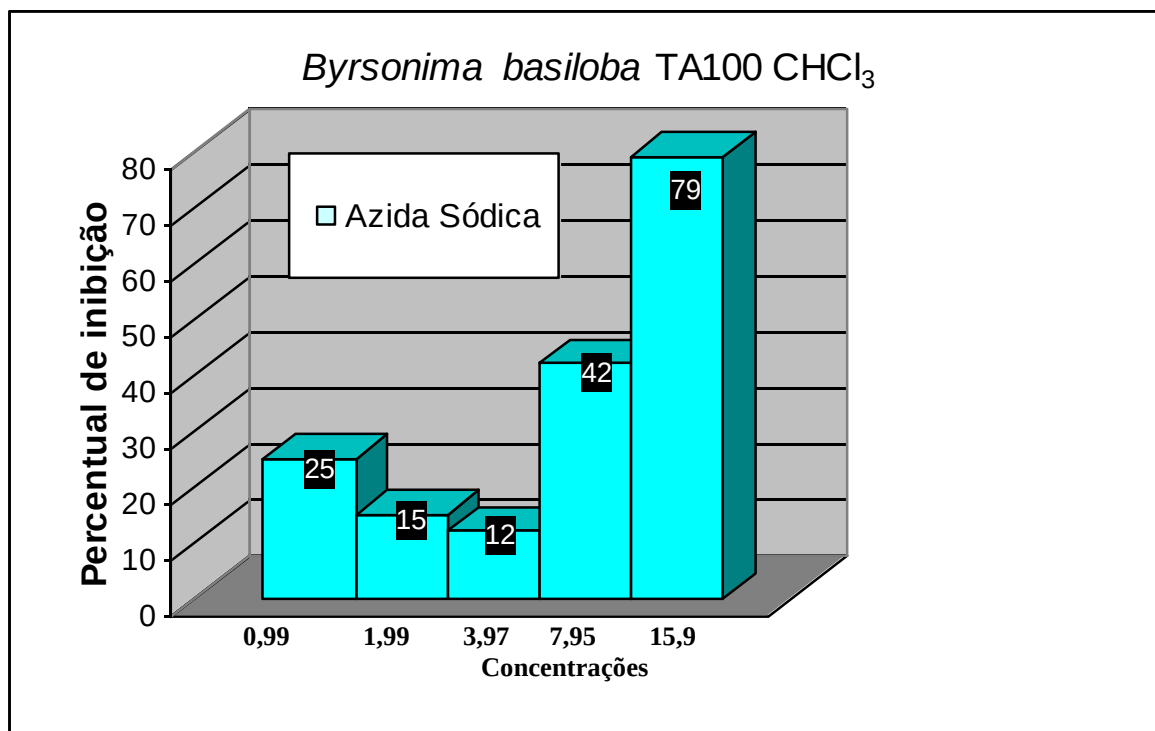


Figura 11: Percentual de inibição do extrato CHCl₃ de *B. basiloba* quando testado com a linhagem TA100; Azida Sódica (1,25 µg/placa); CHCl₃ – Extrato Cloroformico.

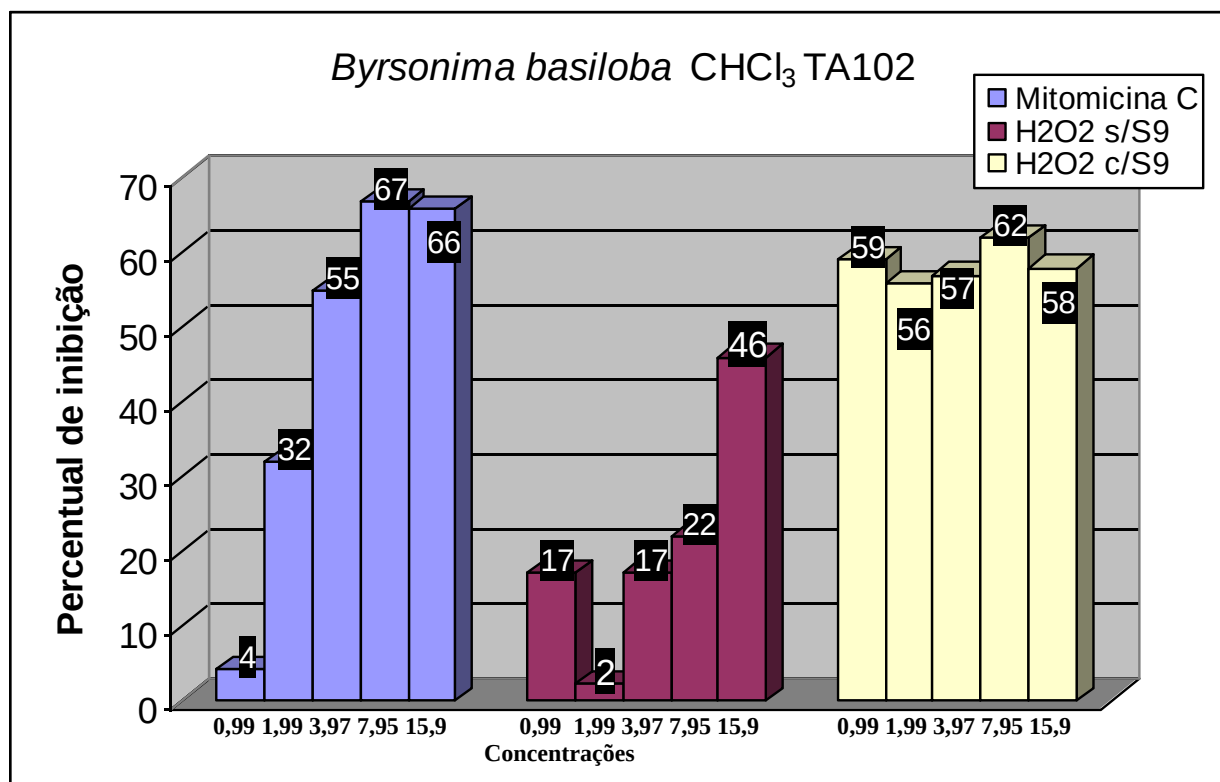


Figura 12: Percentual de inibição do extrato CHCl₃ de *B. basiloba* quando testado com a linhagem TA102; Mitomicina C (0,5 µg/placa); H₂O₂= Peróxido de hidrogênio (0,034mg/placa); CHCl₃ – Extrato Clorofórmico.

Estudo fitoquímico do extrato CHCl₃ de *B. basiloba*

As substâncias isoladas a partir do fracionamento do extrato CHCl₃ de *B. basiloba* são apresentados na Tabela 6.

Tabela 6.perfil fitoquímico do extrato clorofórmico de *B. basiloba*.

Triacontano
Dotriacontano
Lupeol
Acido ursólico
Acido oleanólico
Catequina
Quercetina-3-O- α -L-arabinopiranosídeo
Ácido gálico
Galato de metila
Proantocianidinas

Dados cedidos pela equipe do Dr. Wagner Vilegas.

4.1.2 *Byrsonima crassa*

Extrato CHCl₃ de *Byrsonima crassa*

Mutagenicidade

Foi realizada a avaliação do potencial mutagênico do extrato CHCl₃ e os resultados não evidenciaram atividade mutagênica (CARDOSO et. al 2006).

Antimutagenicidade

As concentrações testadas do extrato CHCl₃ de *B. crassa* na linhagem TA97a não apresentaram redução no número de colônias revertentes frente ao agente mutagênico direto (NPD) (Tabela 7; Figura 13). Entretanto, mostrou-se positivo na redução no número de colônias revertentes, para as cinco concentrações testadas contra mutágenos indiretos (AFB1, B[A]P) (Tabela 8; Figura 13).

As concentrações testadas do extrato CHCl_3 de *B. crassa* na linhagem TA98, não mostraram uma redução no número de colônias revertentes frente a ação do NPD (Tabela 7, Figura 14). Em presença de S9, o extrato mostrou uma redução significativa no número de colônias revertentes por placa (Tabela 8). Analisando-se o resultado obtido na linhagem TA98 frente ao NPD associado ao extrato CHCl_3 de *B. crassa*, observa-se um aumento no número de revertentes, que, provavelmente é resultado de uma interação mutágeno extrato, aumentando o potencial mutagênico do NPD (Tabela 7).

A linhagem TA100 demonstra que foi possível reduzir o número de colônias revertentes com o extrato CHCl_3 de *B. crassa* com valores em torno de 50%, quando testada frente a mutágenos diretos (Tabela 7, Figura 15). Na presença de S9, a redução no número de colônias revertentes pode ser observada quando testado contra o potencial mutagênico do B[a]P. Porém, apresentou efeito citotóxico frente a AFB_1 (Tabela 8, Figura 15).

Nos testes realizados sem metabolização com a linhagem TA102 não foi verificado redução significativa no número de colônias revertentes quando testado frente a MC nas duas menores concentrações. Entretanto, quando testado frente ao peróxido de hidrogênio sem ativação metabólica, o extrato apresentou índice de redução significativo no número de colônias revertentes, em todas as concentrações testadas (Tabela 7, Figura 16). Com ativação metabólica também demonstraram redução significativa (Tabela 8, Figura 16).

Tabela 7. Atividade antimutagênica expressa pela média, desvio padrão do número de revertentes e percentual de inibição (valor entre parênteses) do extrato CHCl₃ *B. crassa* frente a compostos mutagênicos –S9, utilizando as linhagens TA97a, TA98, TA100 e TA102 de *S. typhimurium*.

Linhagens	Mutágenos	Concentração do extrato (mg/placa)				
		Número derevertentes M±SD		(% inibição)		
NPD						
		0,74	1,48	2,97	5,95	8,95
TA97a	810±30	711±35 (12)	826±72 (0)	823±40 (0)	729±55 (10)	724±32 (10)
TA98						
	504±9	1270±274 (0)	823±185 (0)	738±42 (0)	509±82 (0)	530±37 (0)
AZS						
TA100						
	2373±90	1493±182 (37)	1330±112 (44)*	1167±125 (50)*	1122±98 (52)*	1074±141 (54)*
MC						
TA102	1737±77	1062±147 (38)	1057±134 (39)	910±90 (47)*	900±83 (48)*	948±55 (45)*
H ₂ O ₂						
TA102	614±18	325±15 (47)*	340±3 (44)*	268±15 (56)*	205±14 (66)*	162±2 (73)*

NPD (4-nitro-*o*-phenilenediamina – 10,0 µg/placa); AZS = Azida Sódica (1,25 µg/placa); MC = Mitomicina C (0,5 µg/placa); H₂O₂= Peróxido de hidrogênio (0,034mg/placa); MeOH – Extrato Metanólico. Tox= viabilidade < 60%; *= antimutagênico.

Tabela 8. Atividade antimutagênica expressa pela média, desvio padrão do número de revertentes e percentual de inibição (valor entre parênteses) do extrato CHCl₃ de *B. crassa* frente a compostos mutagênicos +S9, utilizando as linhagens TA97a, TA98, TA100 e TA102 de *S. typhimurium*

Linhagens	Mutagenos	Concentração do extrato (mg/placa)				
		Número de revertentes M±SD (% inibição)				
AFB ₁						
		0,74	1,48	2,97	5,95	8,95
TA97a	1182,66±45	232±14 (80)*	216±6 (82)*	182±7 (85)*	181±5 (85)*	178±9 (85)*
TA98	613±16	184±10 (70)*	205±17 (67)*	194±2 (68)*	183±9 (70)*	135±10 (78)*
TA100	1627±77	436±8.5 (tox)	338±9.2 (tox)	256±9.6 (tox)	131±9,5 (tox)	80±12 (tox)
B[a]P						
TA97a	794±6	289±20 (63)*	286±46 (63)*	219±20 (72)*	246±8 (69)*	147±5 (81)*
TA98	595±1	53±9 (91)*	54±1 (91)*	40±2 (93)*	41±1 (93)*	28±5 (95)*
TA100	710±22	280±36 (61)*	219±4 (69)*	149±28 (79)*	143±46 (80)*	130±15 (82)*
H ₂ O ₂						
TA102	614±18	235±16 (61)*	198±21 (67)*	135±19 (78)*	148±39 (76)*	107±21 (83)*

H₂O₂= Peróxido de hidrogênio (0,034mg/placa); AFB₁=Aflatoxina (0,5µg/placa); B[a]P= Benzo(a)pireno (1µg/placa); CHCl₃ – Extrato Cloroformico. Tox= viabilidade < 60%; *= antimutagênico

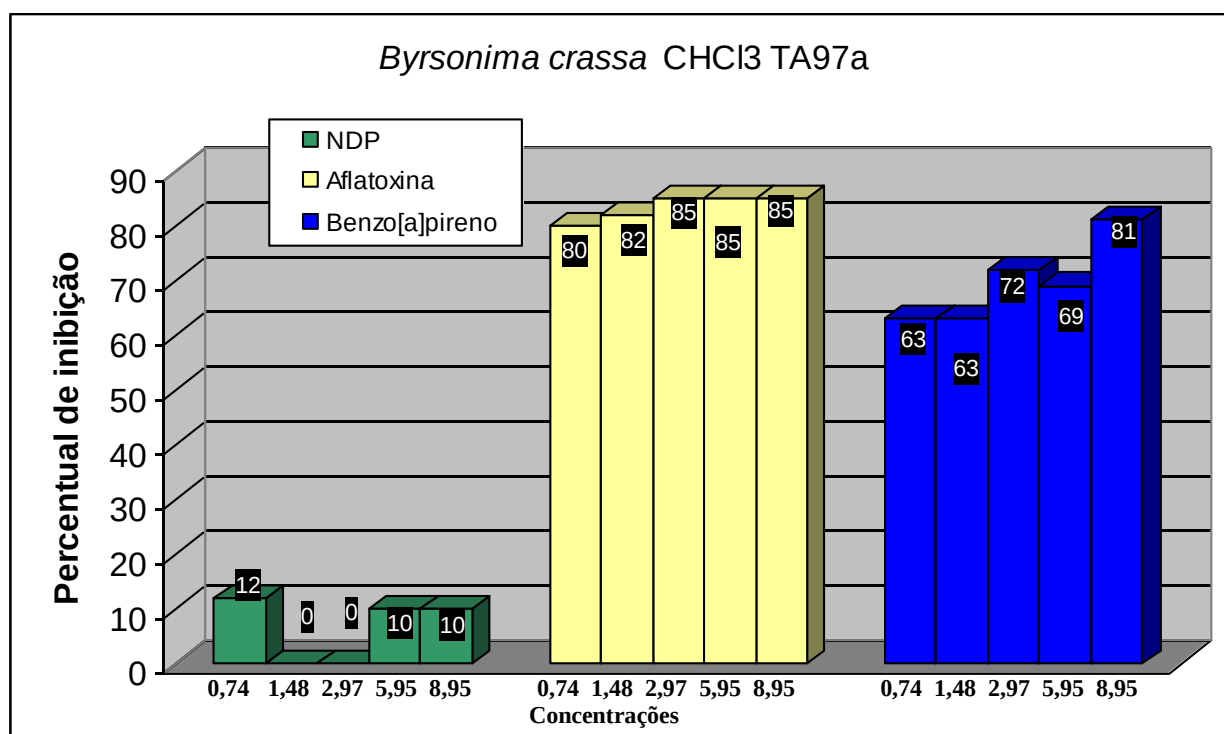


Figura 13: Percentual de inibição do extrato CHCl₃ de *B. crassa* quando testado com a linhagem TA97a. NPD (4-nitro-*o*-phenilenediamina – 10,0 µg/placa); Aflatoxina B₁ (0,5µg/placa), Benzo[a]pireno (1µg/placa); CHCl₃ – Extrato Clorofórmico.

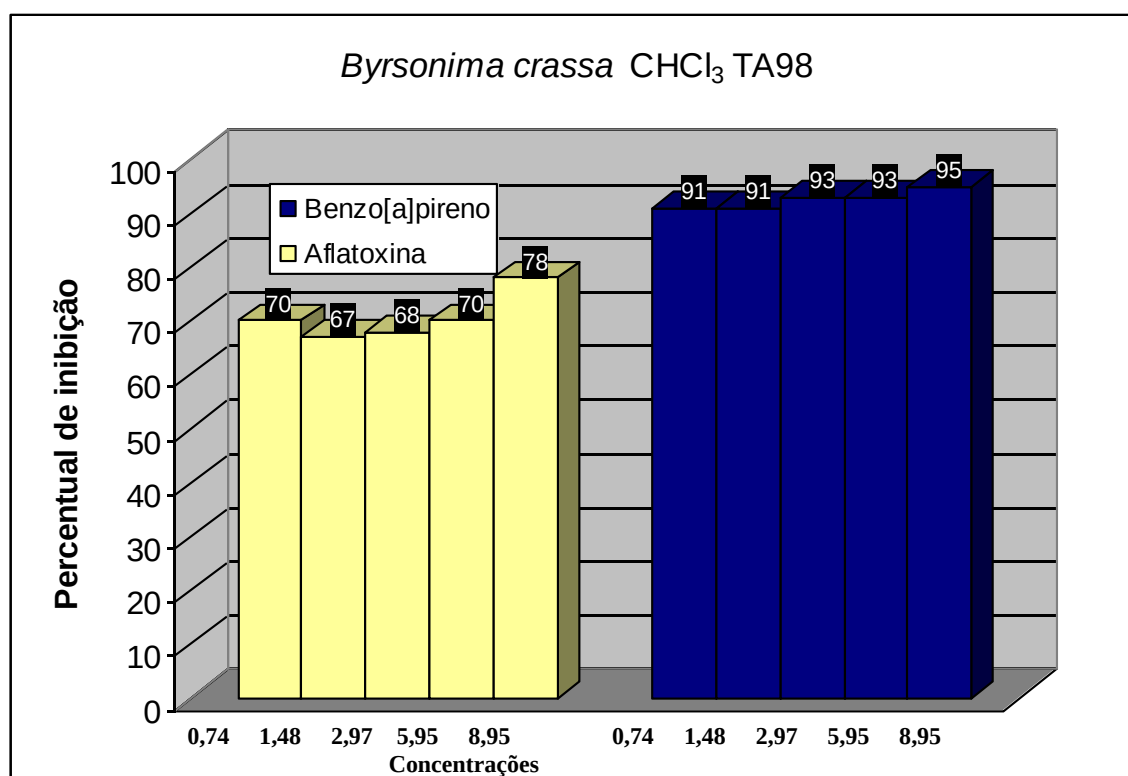


Figura 14: Percentual de inibição do extrato CHCl₃ de *B. crassa* quando testado com a linhagem TA98. NPD (4-nitro-*o*-phenilenediamina – 10,0 µg/placa); Aflatoxina B₁ (0,5µg/placa), Benzo[a]pireno (1µg/placa); CHCl₃ – Extrato Clorofórmico.

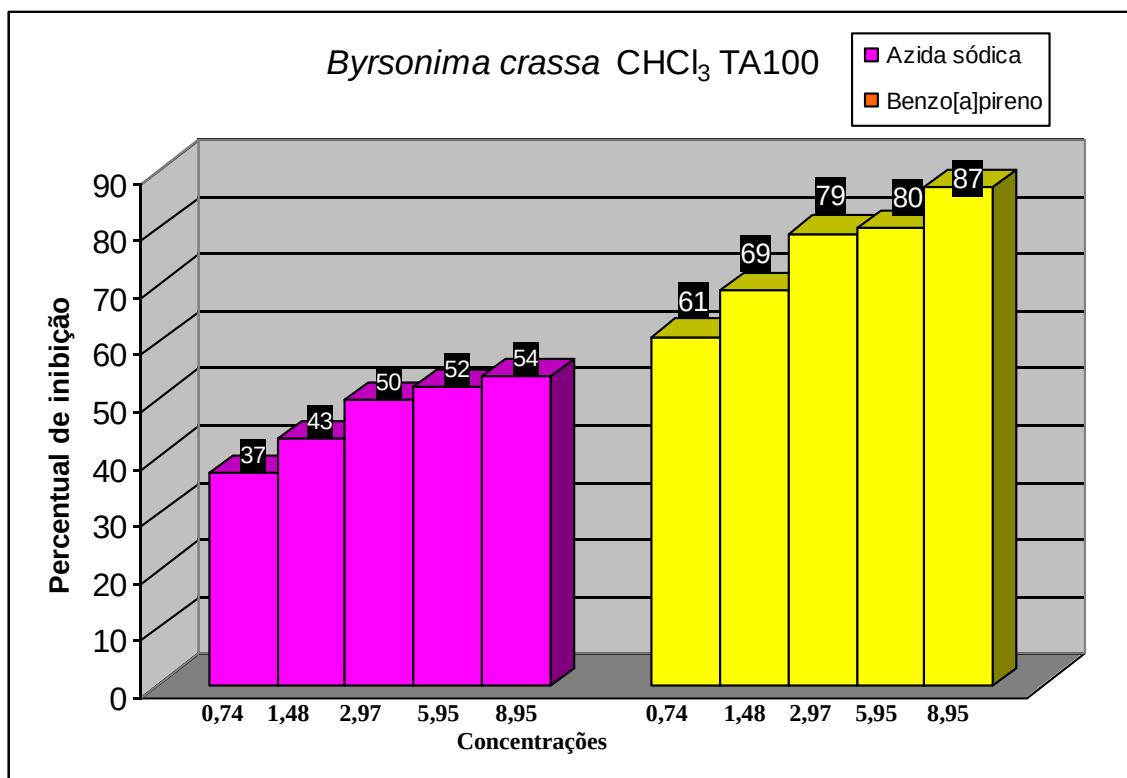


Figura 15: Percentual de inibição do extrato CHCl₃ de *B. crassa* quando testado com a linhagem TA100. Azida Sódica (1,25 µg/placa); Aflatoxina B₁ (0,5 µg/placa); Benzo[a]pireno (1 µg/placa); CHCl₃ – Extrato Clorofórmico.

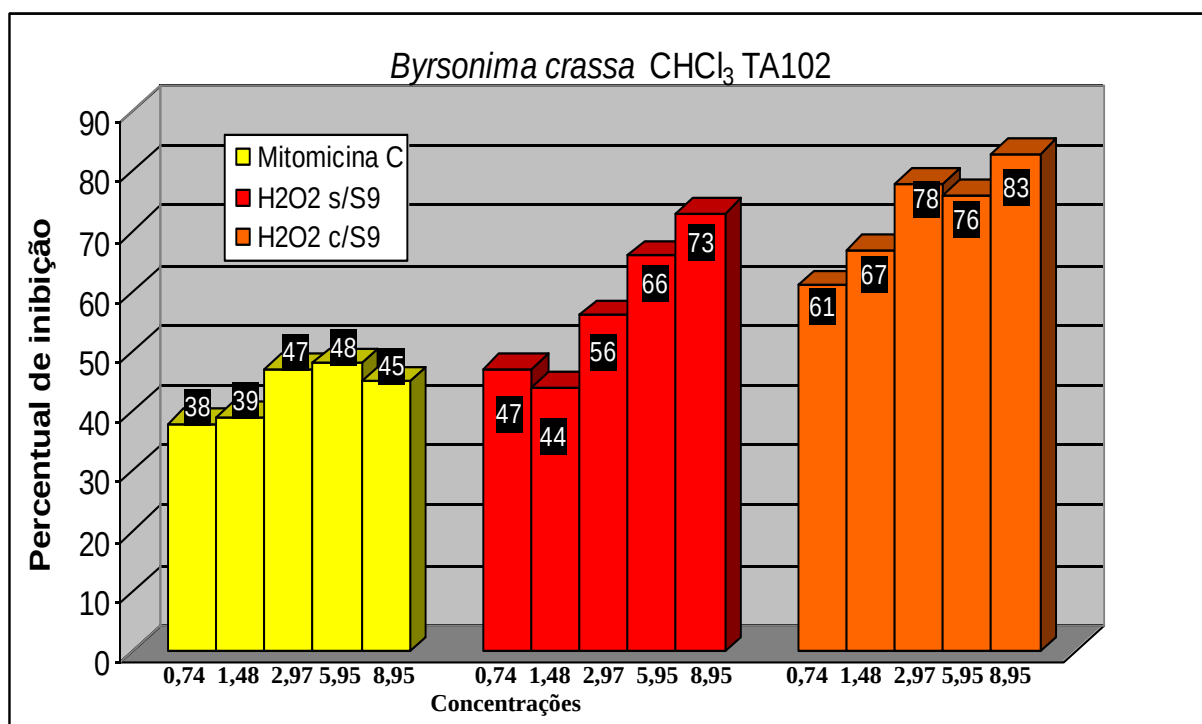


Figura 16: Percentual de inibição da mutagenicidade pelo do extrato CHCl₃ de *B. crassa* quando testado com a linhagem TA102. Mitomicina C (0,5 µg/placa); H₂O₂ = Peróxido de hidrogênio (0,034 mg/placa); CHCl₃ – Extrato Clorofórmico.

Estudo fitoquímico do extrato CHCl₃ de *B. crassa*

As substâncias isoladas no estudo fitoquímico do extrato CHCl₃ de *B. crassa* estão demonstradas na Tabela 9.

Tabela 9. Perfil fitoquímico do extrato clorofórmico de *B. crassa*.

Àcido Gálico
Galato de metila
Quercetina-3-O-β-D- Glucopiranosídeo
Quercetina-3-O-β-D-Galactopiranosídeo
Quercetina-3-O-α-L-Arabinopiranosídeo
Quercetina-3-O-α-L (2''-Galoil)-Arabinopiranosídeo
Quercetina-3-O-β-D-(2''-Galoil)-Galactopiranosídeo
Lupeol
α-Amirina
β-Amirina
α-Amirenona
Amentoflavona
(+)-Catequina
(-)-Epicatequina

Dados cedidos pela equipe do Dr. Wagner Vilegas.

4.1.3 *Davilla elliptica*

Extrato CHCl₃ de *Davilla elliptica*

Mutagenicidade

Os resultados do teste de mutagenicidade do extrato CHCl₃ de *Davilla elliptica*, estão mostrados na Tabela 10 e na Figura 17. Fica evidente que o extrato mostrou-se não mutagênico frente as linhagens TA100, TA102 e TA97a, quando testado com e sem ativação metabólica. Entretanto, quando foi avaliado frente a linhagem TA98

com ativação metabólica o referido extrato apresentou-se mutagênico para as duas menores concentrações.

Tabela 10: Atividade mutagênica do extrato CHCl_3 da planta *Davilla elliptica* nas linhagens TA98, TA97a, TA100 e TA102 de *Salmonella typhimurium*, em ausência e presença de ativação metabólica.

Tratamento (mg/placa)	Número de revertentes/placa em linhagens de <i>S.typhimurium</i> (M $\pm$ SD)							
	TA98		TA97a		TA100		TA102	
	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9
CHCl_3								
0,00 ^a	17 $\pm$ 4	22 $\pm$ 3	162 $\pm$ 15	143 $\pm$ 8	188 $\pm$ 50	142 $\pm$ 16	316 $\pm$ 12	244 $\pm$ 26
0,65	23 $\pm$ 4	54 $\pm$ 4 ^{**}	181 $\pm$ 7	184 $\pm$ 16	158 $\pm$ 18	152 $\pm$ 9	310 $\pm$ 10	322 $\pm$ 15 [*]
1,30	17 $\pm$ 5	59 $\pm$ 7 ^{**}	191 $\pm$ 20	183 $\pm$ 17	167 $\pm$ 16	133 $\pm$ 9	315 $\pm$ 56	363 $\pm$ 10 [*]
2,60	16 $\pm$ 6	34 $\pm$ 4 [*]	197 $\pm$ 26	171 $\pm$ 19	163 $\pm$ 6	135 $\pm$ 5	203 $\pm$ 30	341 $\pm$ 10 [*]
5,20	16 $\pm$ 3	27 $\pm$ 5	236 $\pm$ 15 [*]	188 $\pm$ 16	207 $\pm$ 0	160 $\pm$ 22	162 $\pm$ 14	239 $\pm$ 18
7,80	19 $\pm$ 6	29 $\pm$ 4	192 $\pm$ 19	145 $\pm$ 7	205 $\pm$ 38	117 $\pm$ 35	125 $\pm$ 9	247 $\pm$ 34
C+ ^b	463 $\pm$ 59	381 $\pm$ 40	1115 $\pm$ 8	813 $\pm$ 10	1118 $\pm$ 3	779 $\pm$ 59	908 $\pm$ 61	1688 $\pm$ 36

*P<0.05 (ANOVA) **P<0.01 (ANOVA), M $\pm$ SD= média $\pm$ desvio padrão ^a Controle negativo: dimetilsulfóxido, 75 μ l/placa. ^b Controles positivos: 4-nitrofenilenodiamino, 10 μ g/placa (TA98 e TA97a); azida sódica, 2,5 μ g/placa (TA100); mitomicina, 3 μ g/placa (TA102), em ausência de S9 e 2-antramino, 3 μ g/placa (TA98, TA97a,TA100); 2-aminofluoreno, 10 μ g/placa (TA102).

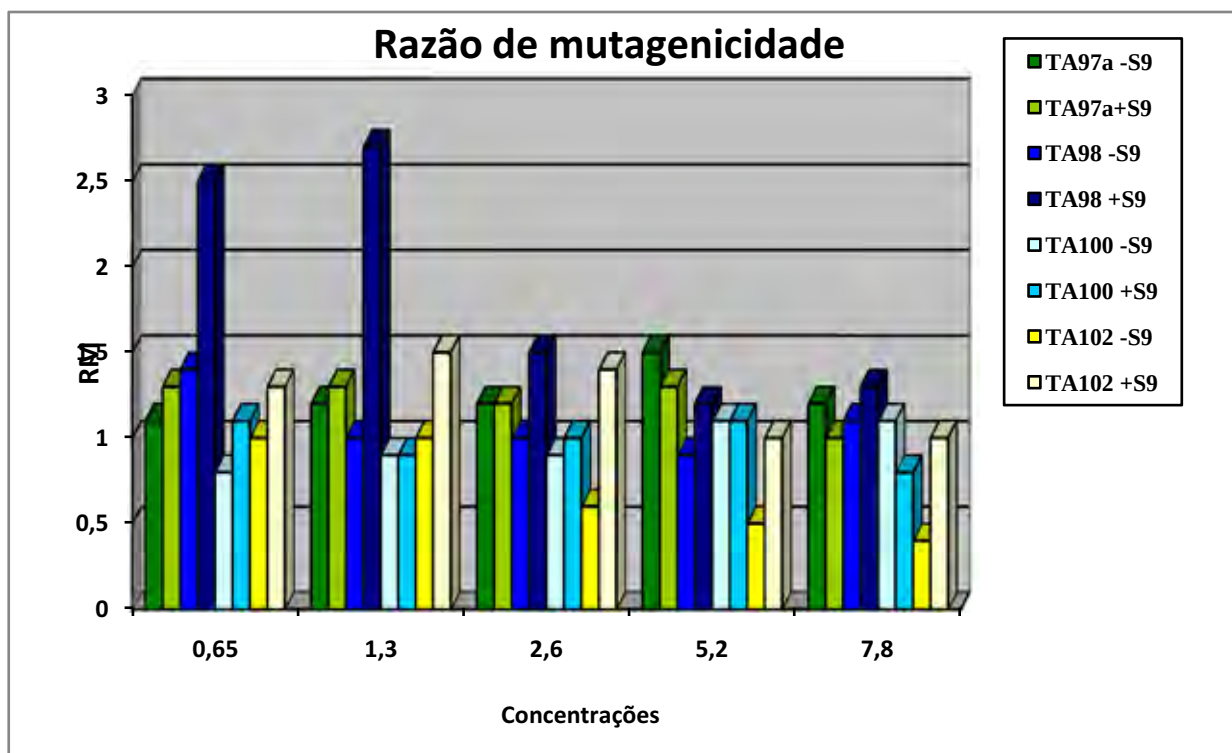


Figura 17. Razões de mutagenicidade (RM) observadas nas linhagens de *Salmonella typhimurium* expostas a diferentes concentrações do extrato CHCl₃ da planta *Davilla elliptica*, na ausência e presença de ativação metabólica (S9). Esses resultados foram cedidos pela pós-graduanda Fabiana I. Biso que desenvolve o trabalho de mutagenicidade com essa espécie.

Antimutagenicidade

Os resultados mostraram que para linhagem TA97a houve uma redução significativa do número de colônias revertentes quando utilizadas até a concentração de 8,35mg/placa contra a ação do mutágeno direto NPD (Tabela 11, Figura 18). Quando avaliado com ativação metabólica o extrato mostrou-se citotóxico para AFB₁, porém, foi efetivo contra a ação do B[a]P (Tabela 12, Figura 18).

Na TA98 o extrato CHCl₃ de *D. elliptica*, também apresentou uma diminuição significativa do número de colônias revertentes em algumas das concentrações utilizadas sem ativação metabólica (Tabela 11, Figura 19). Os testes de avaliação do extrato com ativação metabólica (+S9) também mostraram que houve uma redução

significativa no número de colônias revertentes por placa. (Tabela 12, figura 19). Com índices de redução de até 95%.

Verificou-se também a ocorrência de redução no número de colônias revertentes quando testado em conjunto com a AZS na linhagem TA100 (Tabela 11). E quando testado contra o potencial mutagênico da AFB₁ e do B[a]P, mostrou-se eficiente frente a AFB₁, porém, foi citotóxico para as duas maiores concentrações quando testado em conjunto com B[a]P (Tabela 12, Figura 20).

Nos testes realizados sem metabolização com a linhagem TA102 frente a MC foi possível observar uma redução significativa no número de colônias revertentes apenas para as maiores concentrações. Utilizando o peróxido de hidrogênio com o agente indutor sem ativação metabólica, o extrato apresentou índice de redução significativo no número de colônias revertentes para maioria das concentrações avaliadas (Tabela 11, Figura 21) Os testes realizados com ativação metabólica, também, demonstraram que ocorreu redução significativa para as concentrações testadas (Tabelas 12, Figura 21).

TA97a	794±6	711±31 (10)	440±37 (44)*	397±89 (50)*	228±41 (71)*	178±16 (77)*
TA98	595±1	51±1 (91)*	38±6 (94)*	49±13 (91)*	30±11 (95)*	30±8 (95)*
TA100	710±22	268±36 (62)*	224±12 (68)*	160±34 (77)*	118±12 (tox)	120±29 (tox)
H₂O₂						
TA102	614±18	255±20 (58)*	340±18 (45)*	223±22 (64)*	209±13 (66)*	211±27 (66)*

(H₂O₂) Peróxido de hidrogênio (0,034mg/placa); AFB₁ =Aflatoxina B1 (0,5µg/placa), B(a)P = Benzo[a]apireno (1µg/placa); CHCl₃ – Extrato Clorofórmico. Tox= viabilidade < 60%; *= antimutagênico.

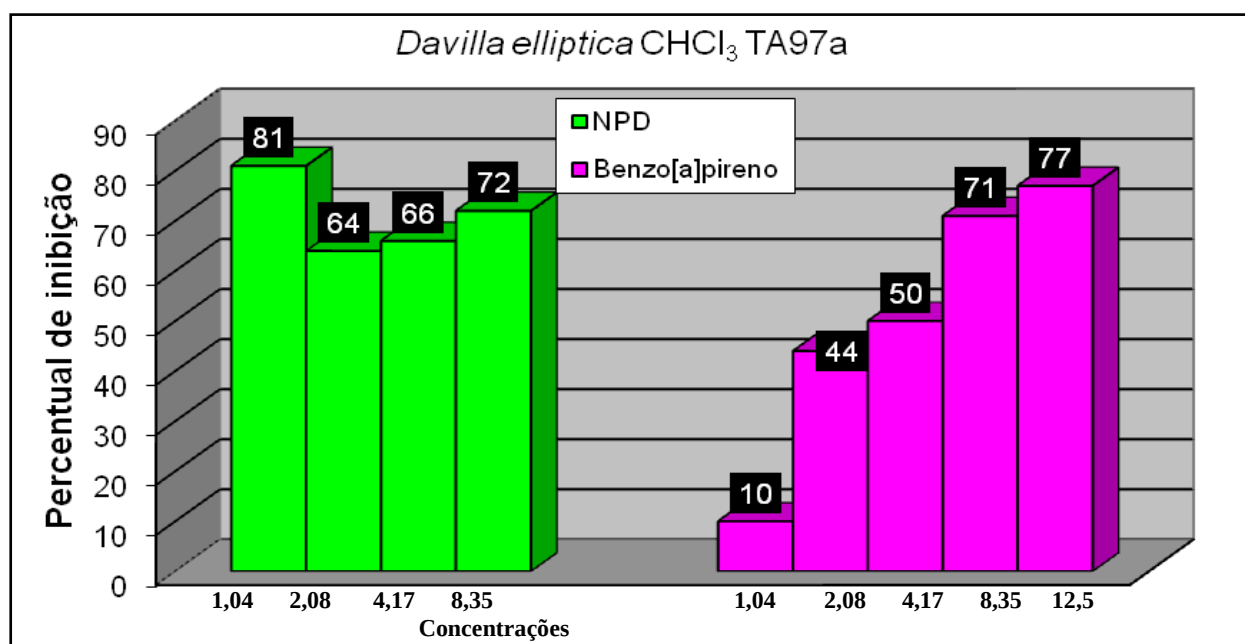


Figura 18. Percentual de inibição do extrato CHCl₃ de *D. elliptica* quando testado com a linhagem TA97a. NPD (4-nitro-*o*-phenilenediamina – 10,0 µg/placa); Benzo[a]apireno (1µg/placa); CHCl₃ – Extrato Clorofórmico.

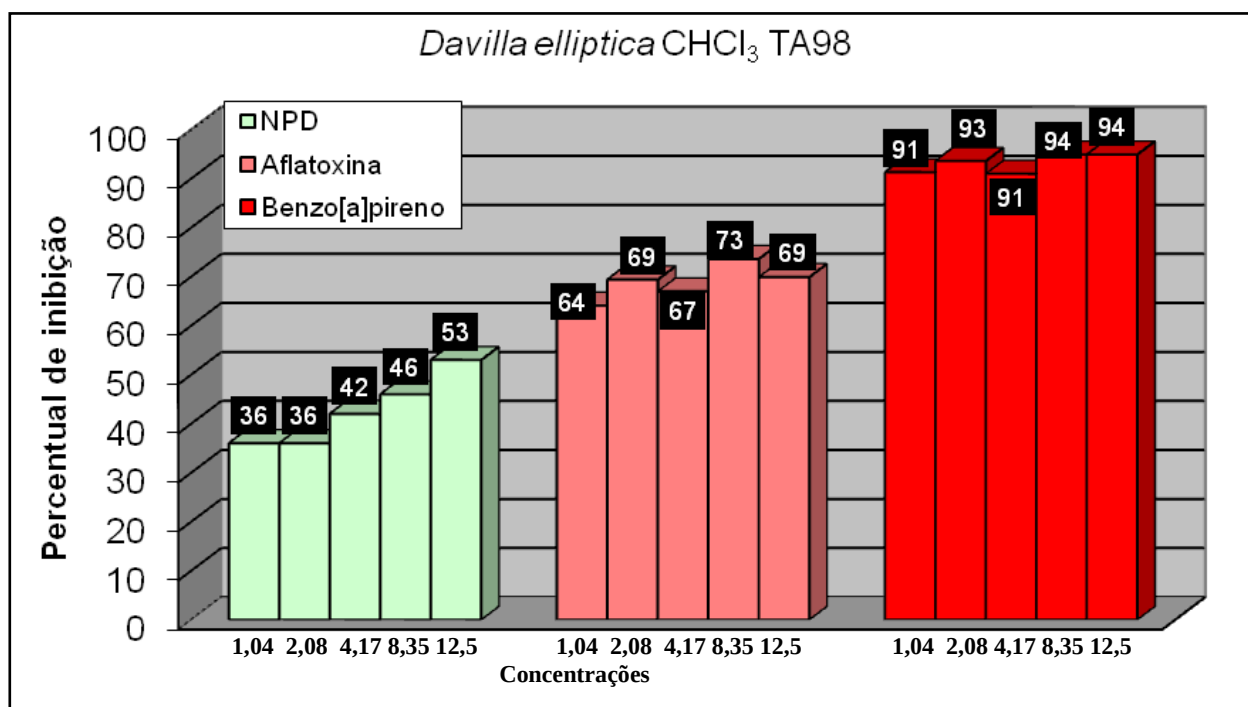


Figura 19: Percentual de inibição do extrato CHCl₃ de *D. elliptica* quando testado com a linhagem TA98; NPD (4-nitro-o-phenilenediamina – 10,0 µg/placa); Aflatoxina B₁ (0,5µg/placa), Benzo[a]pireno (1µg/placa); CHCl₃ – Extrato Clorofórmico

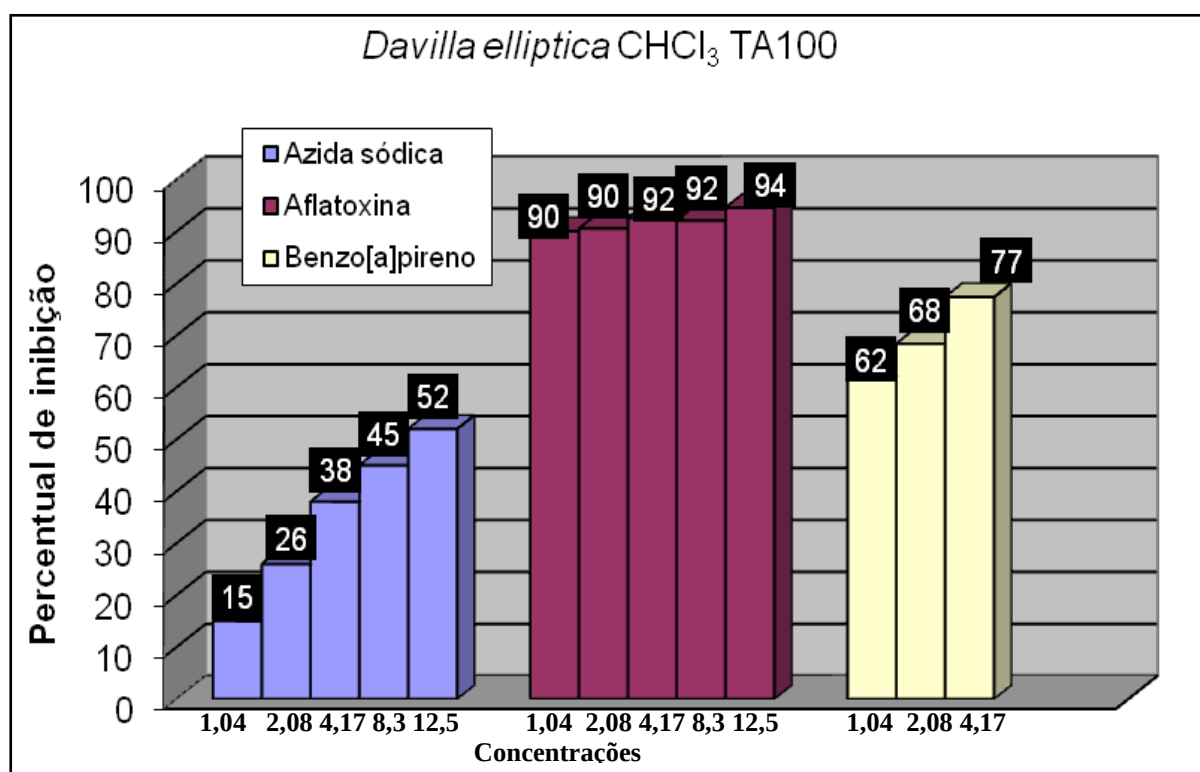


Figura 20: Percentual de inibição do extrato CHCl₃ de *D. elliptica* quando testado com a linhagem TA100. Azida Sódica (1,25 µg/placa); Aflatoxina B₁ (0,5µg/placa), Benzo[a]pireno (1µg/placa); CHCl₃ – Extrato Clorofórmico.

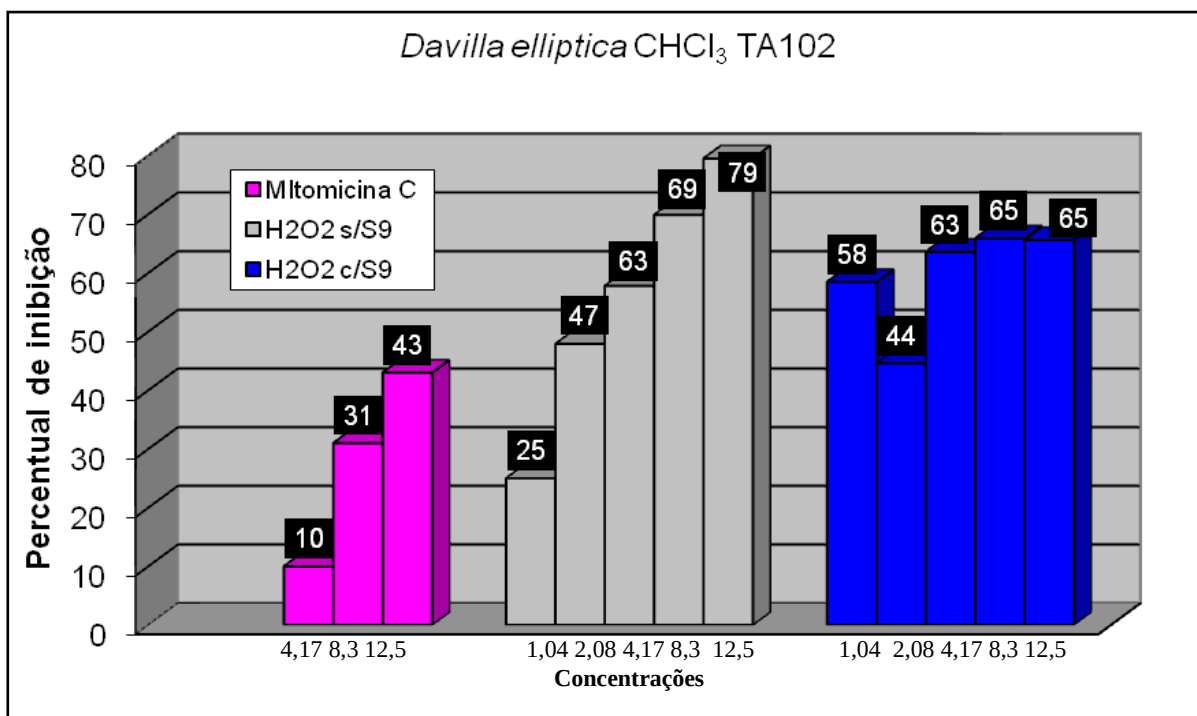


Figura 21: Percentual de inibição do extrato CHCl₃ de *D. elliptica* quando testado com a linhagem TA102; Mitomicina C (0,5 µg/placa); (H₂O₂) Peróxido de hidrogênio (0,034mg/placa); CHCl₃ – Extrato Clorofórmico.

Estudo fitoquímico do extrato CHCl₃ de *D. elliptica*

Os dados do estudo fitoquímico realizado com o extrato CHCl₃ de *D. elliptica* estão apresentados na Tabela 13.

Tabela 13: Perfil fitoquímico do extrato clorofórmico de *D. elliptica*.

Ácido Gálico
Quercetina
Miricetina
Quercetina-3-O-β-D-Galactopiranosídeo
Quercetina-3-O-α-L-Raminopiranosídeo (Quercitrina)
Miricetina-3-O-α-L-Raminopiranosídeo (Miricitrina)
Quercetina-3-O-α-L-Raminopiranosil-(1→6)-β-D- Glucopiranosídeo- (Rutina)
Miricetina-3-O-α-L-(2''-Galoil)-Raminopiranosídeo
Miricetina-3-O-α-L-(3''-Galoil)-Raminopiranosídeo
Miricetina-3-O-β-D-Galactopiranosídeo
Miricetina-3-O-β-D-Glucopiranosídeo
Miricetina-3-O-β-D-(2''-O-Galoil)-Galactopiranosídeo
(-)-epicatequina
Vomifoliol

Dados cedidos pela equipe do Dr. Wagner Vilegas

4.2 Teste do micronúcleo

4.2.1 Mutagenicidade

Foi empregado o teste do micronúcleo em células do sangue periférico de camundongos, submetidos a tratamento agudo, para avaliar o potencial mutagênico dos extratos vegetais CHCl₃ e MeOH de *B. basiloba*, CHCl₃ de *B. crassa* e CHCl₃ de *D. elliptica*.

Os resultados na Tabela 14 mostram que quando comparados os grupos tratados com os extratos com o grupo controle negativo, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas. Todos os extratos foram avaliados na maior concentração utilizada.

TABELA 14. Número de células micronucleadas por animal, média e desvio padrão para camundongos tratados com os extratos de diferentes espécies vegetais, diluídos em óleo de soja, via *gavage* e os respectivos controles.

Animais							
Tratamento/concentração	F1	F2	F3	M4	M5	M6	Média±SD
Controle positivo	21	23	24	25	22	25	23,33± 1,6
Controle solvente	1	2	2	2	1	3	1,83± 0,75
Controle pos + solvente	15	27	12	18	17	15	17,33±5,16
<i>B. basiloba</i> MeOH/166mg/mL	2	1	3	2	1	1	1,66±0,81
<i>B. basiloba</i> CHCl ₃ /100mg/mL	2	2	1	1	1	1	1,30±0,51
<i>B. crassa</i> CHCl ₃ /125mg/mL	1	1	1	2	2	1	1,33±0,51
<i>D. elliptica</i> CHCl ₃ /111mg/mL	2	2	1	1	3	1	1,66±0,81

Controle negativo= óleo de soja; Controle Positivo= Ciclofosfamida 50 mg/kg p.c.; CHCl₃= Extrato Clorofórmico, MeOH= extrato metanólico; SD= desvio padrão; P≤0,05.

4.2.2 Antimutagenicidade

A comparação das médias do número de reticulócitos micronucleados (MNRet) obtidos nos tratamentos controle positivo (ciclofosfamida) e na associação ciclofosfamida com o óleo, mostrou que não foi observada redução significativa no

número de células micronucleadas. Portanto, a redução no número de MNRet no tratamento onde ocorreu a associação dos extratos com o agente indutor não foi devida ao óleo. A Tabela 15 mostra os resultados da avaliação do potencial antimutagênico dos extratos nas três diferentes concentrações utilizadas. Na tabela 16 estão os percentuais de redução obtidos.

Extrato MeOH de *B.basiloba*

Pode-se observar que em ensaio realizado com o extrato MeOH de *B.basiloba* associado a ciclofosfamida o número de células micronucleadas sofreu uma redução de 43,73% quando administrado na dosagem de 166mg/mL em relação ao número de células micronucleadas do grupo tratado apenas com ciclofosfamida. Para concentração de 124,5mg/mL a redução apresentada no número de células micronucleadas foi de 49,66%. Sendo que, quando a concentração foi reduzida para 83 mg/mL o índice de redução observado caiu para 42,97%. As reduções no número de MNRet apresentadas pelas concentrações utilizadas foram estatisticamente significativa $P \leq 0,05$ (Tabela 16). A Figura 22 representa as médias dos números de reticulócitos micronucleados obtidos em cada tratamento.

Extrato CHCl₃ de *B. basiloba*

Quando foram comparadas as médias obtidas nos ensaios com o extrato CHCl₃ de *B. basiloba* associado com ciclofosfamida com as médias do grupo com a associação de controle positivo (só ciclofosfamida) associado com óleo, observa-se que para a concentração de 100mg/mL, a redução no número de micronúcleos é bem menor (7,42%) do que as observadas com as concentrações de 75mg/mL (40%) e de 50mg/mL (40,75%). A redução observada para a concentração de 100mg/mL não foi estatisticamente significativa. Entretanto, a redução no número de reticulócitos micronucleados das outras duas concentrações mostrou-se estatisticamente significativa $P \leq 0,05$ (Figura 23).

Extrato CHCl₃ de *B. crassa*

Para o extrato CHCl₃ de *B. crassa* o resultado obtido para a concentração de 125mg/mL em conjunto com ciclofosfamida foi o único a reduzir significativamente o número de células que apresentaram micronúcleos (48,17%). Para as concentrações de 93,75mg/mL e 62,5mg/mL não ocorreu redução no número de micronúcleos (Figura 24).

Extrato CHCl₃ de *D. elliptica*

O extrato CHCl₃ de *D. elliptica* apresentou resultados positivos para todas concentrações testadas (111 mg/mL, 83,25 mg/mL e 55mg/ml) com índices de redução de 41,56%, 51,86% e 42,9% respectivamente. Portanto, ocorreu redução no número de micronúcleos para todas as concentrações (Figura 25).

Tabela 15: Avaliação antimutagênica dos extratos através do teste de micronúcleo em células de sangue periférico de camundongos tratados com ciclofosfamida.

Tratamento	Animais						Média±SD
	Machos			Fêmeas			
	1	2	3	4	5	6	
Controle -	2	3	4	3	3	4	3,16±0,75
Solvente	3	5	3	6	7	4	4,66±1,63
Controle +	21	23	24	25	22	25	23,33±1,63
Controle (+) + solvente	22	27	25	21	19	21	22,5±2,94
MeOH de <i>B.basiloba</i>							
Ciclo+166mg/mL	11	11	13	11	17	13	12,66±2,33*
Ciclo+124,5mg/mL	11	8	18	12	9	9	11,16±3,65*
Ciclo+83mg/mL	8	19	14	11	12	13	12,83±3,65*
CHCl ₃ de <i>B. basiloba</i>							
Ciclo+100mg/mL	16	16	32	31	16	14	20,83±8,30
Ciclo+75mg/mL	12	9	9	17	22	12	13,5±5,08*
Ciclo+50mg/mL	11	12	13	19	9	16	13,33±,61*
CHCl ₃ de <i>B. crassa</i>							
Ciclo+125mg/mL	14	19	7	12	9	9	11,66±4,36*
Ciclo+93,75mg/mL	32	28	20	35	30	36	30,16±5,81
Ciclo+62,5mg/mL	29	27	28	19	23	18	24±4,73
CHCl ₃ de <i>D. elliptica</i>							
Ciclo+111mg/mL	8	16	14	11	14	16	13,16±3,12*
Ciclo+83,25mg/mL	15	11	9	9	11	10	10,83±2,22*
Ciclo+55,5mg/mL	8	19	14	11	12	13	12,83±3,65*

CHCl₃= clorofórmico; MeOH= metanólico; SD= desvio padrão; Ciclo= Ciclofosfamida; Solvente= óleo de soja; Controle + = Ciclofosfamida 50mg/kg p.c.; Controle - = água; *= P≤0,05.

Tabela 16: Índices de redução do número de micronúcleos obtidos com os extratos testados.

Extrato	Concentração mg/ml	Índice de redução
<i>MeOH de B. basiloba</i>		
	83	42,97%
	124,5	49,66%
	166	43,73%
<i>CHCl₃ de B. basiloba</i>		
	50	40,75%
	75	40%
	100	7,42%
<i>CHCl₃ de B. crassa</i>		
	62,5	0,00%
	93,75	0,00%
	125	48,17%
<i>CHCl₃ de D.elliptica</i>		
	55,5	42,97%
	83,25	51,86%
	111	41,56%

CHCl₃– Extrato Clorofórmico; MeOH – Extrato metanólico.

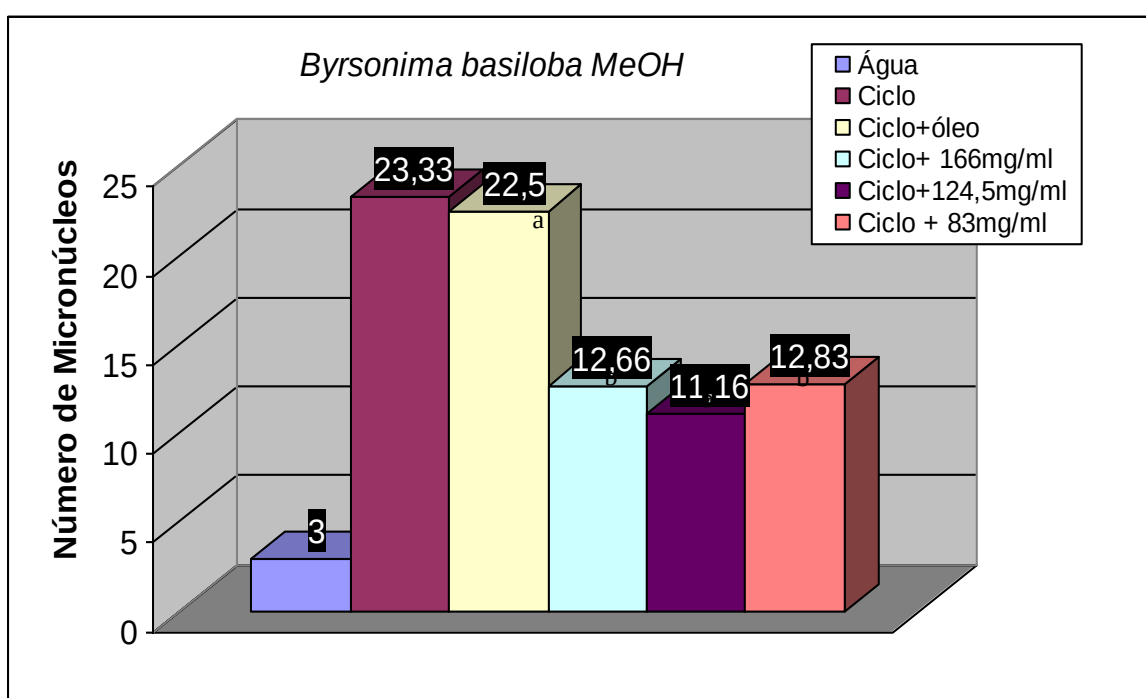


Figura 22: Médias do número de micronúcleo por grupo de tratamento; Ciclo – Ciclofosfamida (50mg/kg peso corpóreo); MeOH – Extrato metanólico. ^a estatisticamente não significativo; ^b estatisticamente significativo ($P \leq 0,05$).

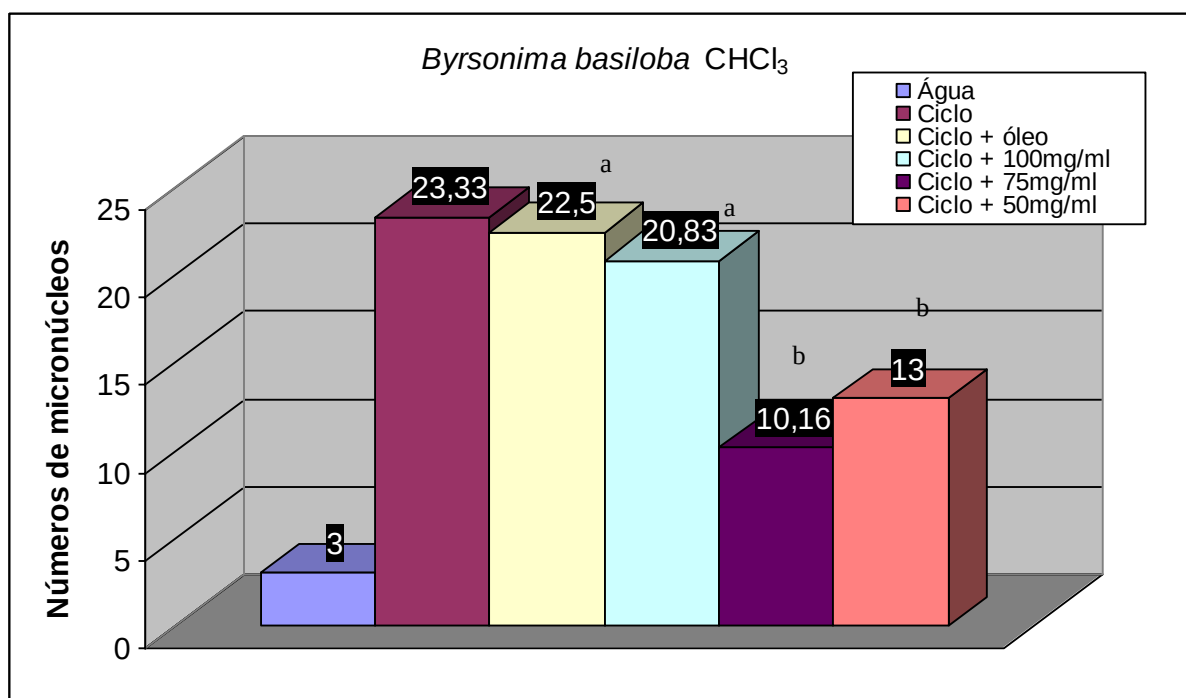


Figura 23: Médias do número de micronúcleo por grupo de tratamento Ciclo – Ciclofosfamida (50mg/kg peso corpóreo); CHCl₃– Extrato Clorofórmico. ^a estatisticamente não significativo; ^b estatisticamente significativo ($P \leq 0,05$).

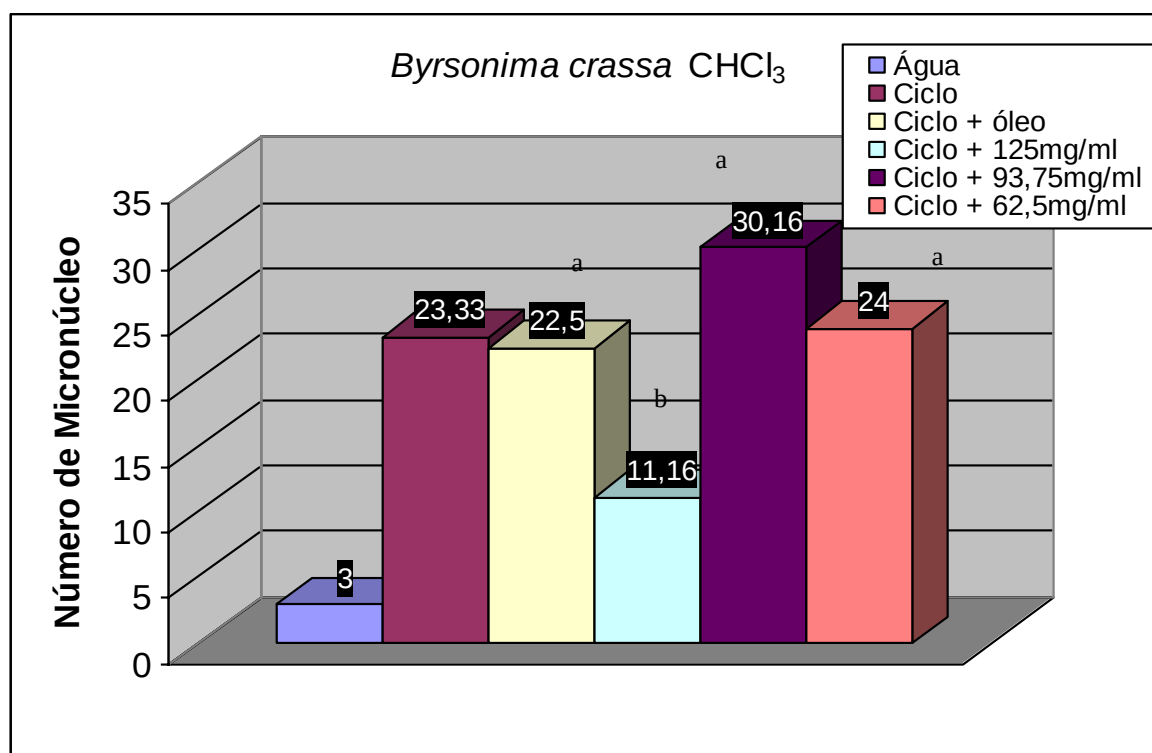


Figura 24: Médias do número de micronúcleo por grupo de tratamento; Ciclo – Ciclofosfamida (50mg/kg peso corpóreo); CHCl₃– Extrato Clorofórmico. ^a estatisticamente não significativo; ^b estatisticamente significativo ($P \leq 0,05$).

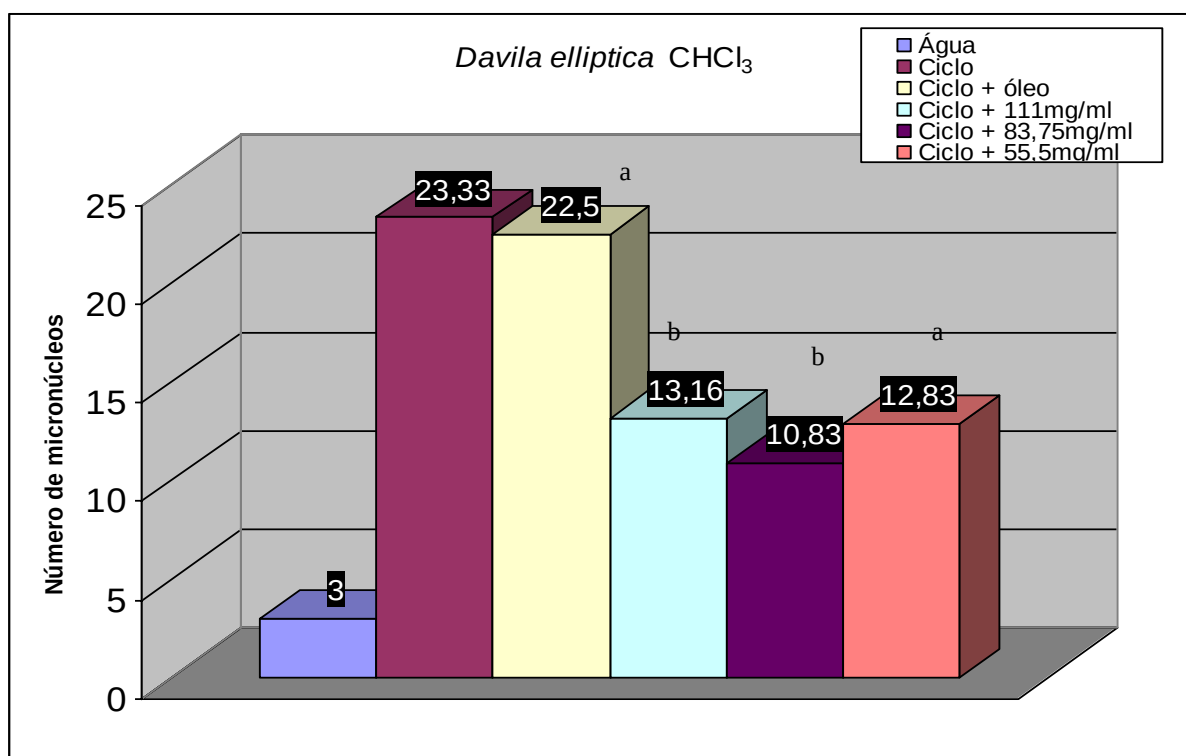


Figura 25: Médias do número de micronúcleo por grupo de tratamento Ciclo – Ciclofosfamida (50mg/kg peso corpóreo); CHCl₃– Extrato Clorofórmico; ^a estatisticamente não significativo; ^b estatisticamente significativo (P≤0,05).

4.3 Substâncias Isoladas

Diante dos resultados dos ensaios de antimutagenicidade apresentados pelos extratos foi necessária a avaliação do potencial mutagênico e antimutagênico de algumas das substâncias isoladas (Ácido gálico, Quercetina-3-o- α -L-raminopiranosídeo, Quercetina, Miricetina-3-o- α -L-raminopiranosídeo, Galato de metila, (+)catequina, Lupeol) a partir dos extratos na tentativa de identificar o possível agente responsável pelas reduções da mutagenicidade induzida. As substâncias avaliadas foram selecionadas pelo rendimento no processo de extração, ou seja, disponibilidade do composto. Por essa razão, algumas das substâncias detectadas no estudo fitoquímico não foram avaliadas.

Para avaliar o potencial mutagênico e antimutagênico destas substâncias, foram realizados ensaios através do teste de Ames e do teste que envolve análise dos danos de DNA plasmidial. Os resultados obtidos estão demonstrados nas Tabelas 17 e 18 e nas Figuras de 26-29. Ensaios *in vivo* não puderam ser realizados devido a quantidade de substâncias isoladas não ter sido suficiente.

4.3.1 Teste de Ames

Para realização do teste de Ames com os compostos isolados foi escolhida a linhagem TA98, por ter sido a linhagem que apresentou os melhores resultados nos testes realizados com os extratos.

Mutagenicidade

Os resultados observados na Tabela 17 demonstram que a maioria dos compostos isolados não induziu aumento da frequência normal de revertentes quando comparados à frequência do controle negativo. Porém, a quercetina foi a única substância que apresentou aumento significativo no número de revertentes.

Tabela 17: Atividade mutagênica expressa pela média, desvio padrão do número de revertentes na linhagem TA98 de *S. typhimurium* tratadas com 75µg/placa das substâncias isoladas dos extratos.

Linhagem		Número de revertentes M±SD									
	ESP	DMSO	NPD	B[a]P	AG	GM	Q	QH	M	C	L
TA98 – S9	48± 4	44± 4	236± 4,3		38± 4	38,25± 4	197,5± 14	41,75± 6,5	51,75± 4	46,25± 9,2	42,75± 9,4
TA98 +S9	46± 3,3	38± 4		196± 4,3	36± 4,5	37,5± 3,7	223± 28,9	33,75± 5,5	37,5± 3,2	45± 7,5	44,5± 4,5

ESP= Espontâneo, DMSO= controle negativo, AG= ácido gálico, GM= galato de metila, Q= quercetina, QH= Quercetina-3-o-α-L-raminopiranosídeo, M= Miricetina-3-o-α- L-raminopiranosídeo, C= catequina, L= lupeol.

Antimutagenicidade

Foi realizada a avaliação do potencial antimutagênico dos compostos isolados dos extratos através do teste de Ames utilizando-se a linhagem TA98 de *S. typhimurium*. Como pode-se observar os melhores resultados foram obtidos quando testado contra o agente indutor direto NPD, sendo que, os melhores índices de redução foram obtidos com o Lupeol e Catequina (53% e 52% respectivamente). O restante das substâncias com exceção da quercetina mantiveram o índice de redução por volta de 40% como mostrado na Tabela 18.

Quando testados contra mutágeno indireto os resultados mostram que os índices de redução giram entorno de 30% que neste trabalho não foram considerados efeitos protetores. Como já descrito anteriormente serão consideradas com efeito protetor satisfatório apenas as substâncias que apresentarem índices de redução acima de 40%.

Tabela 18. Atividade antimutagênica expressa pela média, desvio padrão do número de revertentes e percentual de inibição (valor entre parênteses) dos compostos frente à mutágenos diretos e indiretos, utilizando a linhagem TA98 de *S. typhimurium*.

Número de revertentes M±SD (% inibição)		
Linhagem		
Tratamento	TA98 -S9	TA98 +S9
ESP	48±4	46±3,3
Controle -	44±4	46,3±1,2
Controle +	236±4,3	196±4,3
AG+ Controle +	133,25±13,6 (44)	137,25±12,6 (30)
GM+ Controle +	136,25±11,5 (42)	151,25±3,6 (23)
Q+ Controle +	405±29 (0)	215,7±7,76 (0)
QH+ Controle +	127,5±22,8 (46)	137,5±12,4 (30)
M+ Controle +	137±11,5 (42)	145,5±6,6 (26)
C+ Controle +	112,2±21 (52)	140,5±9 (28)
L+ Controle +	110,75±14,1 (53)	137±0,5 (30)

ESP.= Espontâneo; D=DMSO, AG= ácido gálico, GM= galato de metila, Q= quercetina, QH= quercetina raminopiranosídeo, M= Miricetina-3-o- α - L-raminopiranosídeo, C= catequina, L= lupeol. Controle + (-S9)=NPD (4-nitro-o-phenilenediamina – 10,0 μ g/placa); Controle + (+S9)= Benzo[a]pireno (1 μ g/placa). Para todos os extratos foi utilizada a concentração de 75 μ g/placa.

4.3.2 Teste do Plasmídeo

O teste do plasmídeo foi empregado para analisar o potencial genotóxico e antigenotóxico de algumas substâncias puras obtidas a partir dos extratos MeOH e CHCl₃ de *B. basiloba*, CHCl₃ de *B. crassa* e CHCl₃ de *D. elliptica*. As substâncias utilizadas nesta avaliação foram, Ácido Gálico, Galato de metila, Quercetina-3-o- α -L-raminopiranosídeo, Miricetina-3-o- α - L-raminopiranosídeo, Catequina e Lupeol.

Como mostra a Figura 26, as substâncias não apresentaram potencial genotóxico quando testadas na concentração de 0,9 mg/mL, com exceção da quercetina que promoveu a quebra nesta concentração.

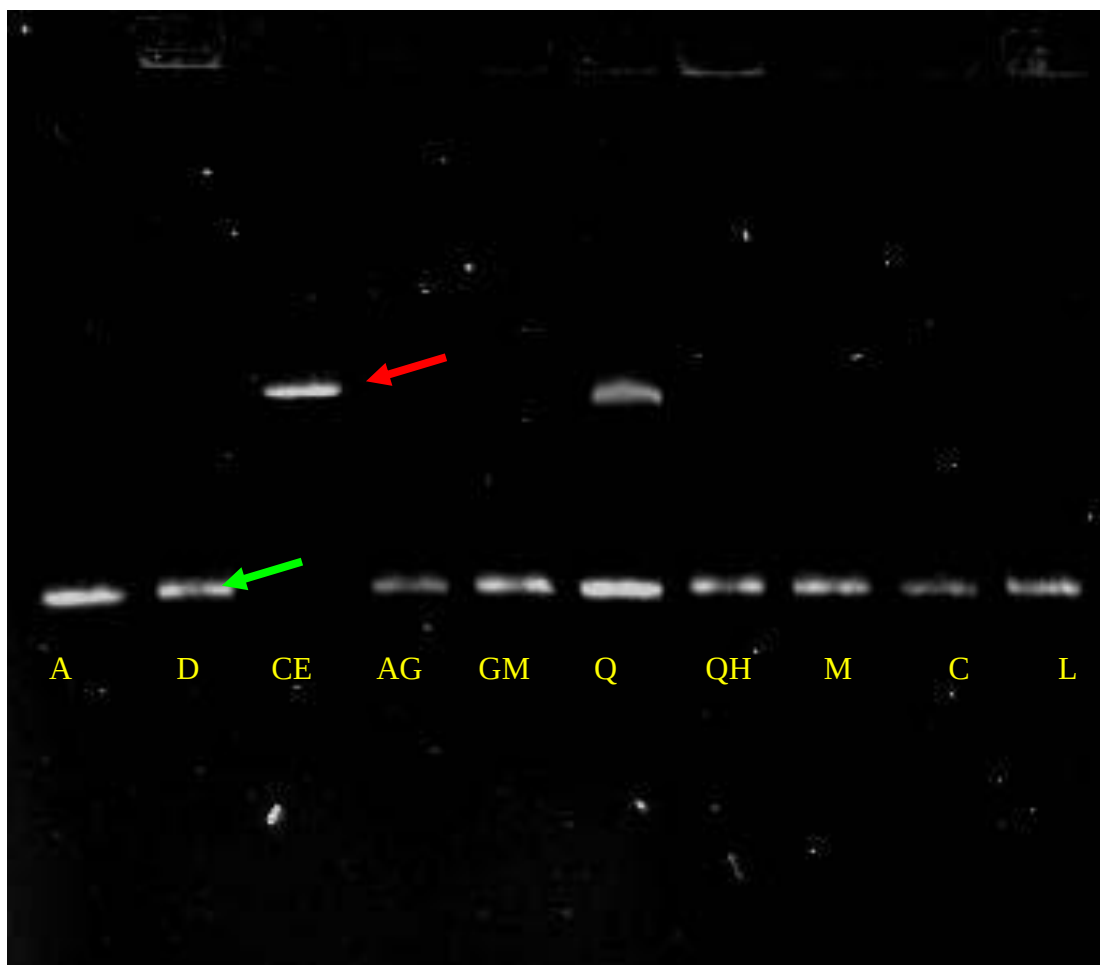


Figura 26: Foto do gel do teste de genotoxicidade das substâncias puras isoladas dos extratos MeOH e CHCl_3 de *B. basiloba*, CHCl_3 de *B. crassa* e CHCl_3 de *D. elliptica*. na concentração de 0,9mg/mL.(A= água, D=DMSO, CE= cloreto de estanho, AG= ácido gálico, GM= galato de metila, Q= quercetina, QH= Quercetina-3-o- α -L-raminopiranosídeo M= Miricetina-3-o- α - L-raminopiranosídeo, C= catequina, L= lupeol. Seta vermelha = DNA plasmidial em forma circulo aberto; seta verde = DNA plasmidial em forma superenovelada.

Para avaliar o potencial antigenotóxico das substâncias isoladas dos extratos, os plasmídeos foram tratados com duas concentrações de cada substância em combinação com cloreto de estanho na concentração de 200 $\mu\text{L/mL}$.

Os testes realizados para verificar o potencial antigenotóxico das substâncias isoladas dos extratos mostram que ambas as concentrações utilizadas na maioria dos casos foram capazes de reduzir os danos causados ao DNA pelo cloreto de

estanho. As fotos dos géis de agarose foram analisadas através do software *AlphaEaserFC* que analisa as imagem obtidas na revelação do gel de eletroforese e que permite fazer comparações pela intensidade do padrão de bandas. A Figura 27 mostra a comparação do percentual de quebras observado nos tratamentos com as duas diferentes concentrações utilizadas, ou seja, na concentração de 0,9 mg/mL e 0,45 mg/mL. Pode-se verificar que o ácido gálico e lupeol quando utilizados na concentração de 0,9mg/mL reduziram de maneira significativa o número de quebras. Diferentemente dos resultados observados com miricetina e catequina, onde houve uma inversão nos resultados obtidos, pois, na concentração de 0,45 mg/mL a redução observada foi maior que a obtida para a concentração de 0,9 mg/mL.

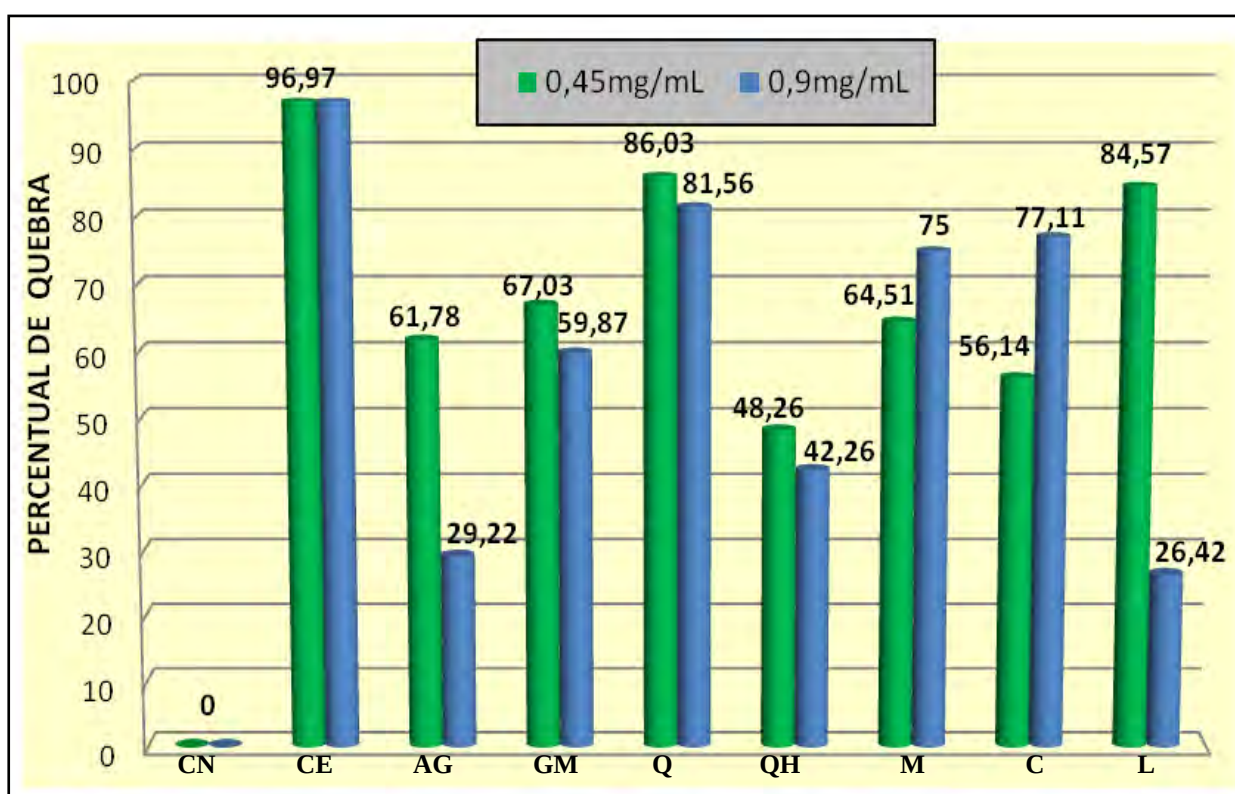


Figura 27. Percentual de quebras. Controles positivos, negativos e tratamento associados controle positivo + compostos (0,9mg/mL e 0,45mg/ml). D=DMSO, CE= cloreto de estanho, AG= Ácido Gálico, GM= Galato de Metila, Q= Quercetina, QH= Quercetina-3-o- α -L-raminopiranosídeo, M= Miricetina-3-o- α -L-raminopiranosídeo, C= Catequina, L= Lupeol.

As figuras 28 e 29 mostram o géis do tratamento das substâncias 0,9 mg/mL e 0,45 mg/mL respectivamente em conjunto com CE 200µg/mL onde pode-se observar as três conformações do plasmídeo quando tratado com CE. No restante dos tratamentos onde houve a associação com as substâncias observa-se apenas as conformações circular e superenovelada.

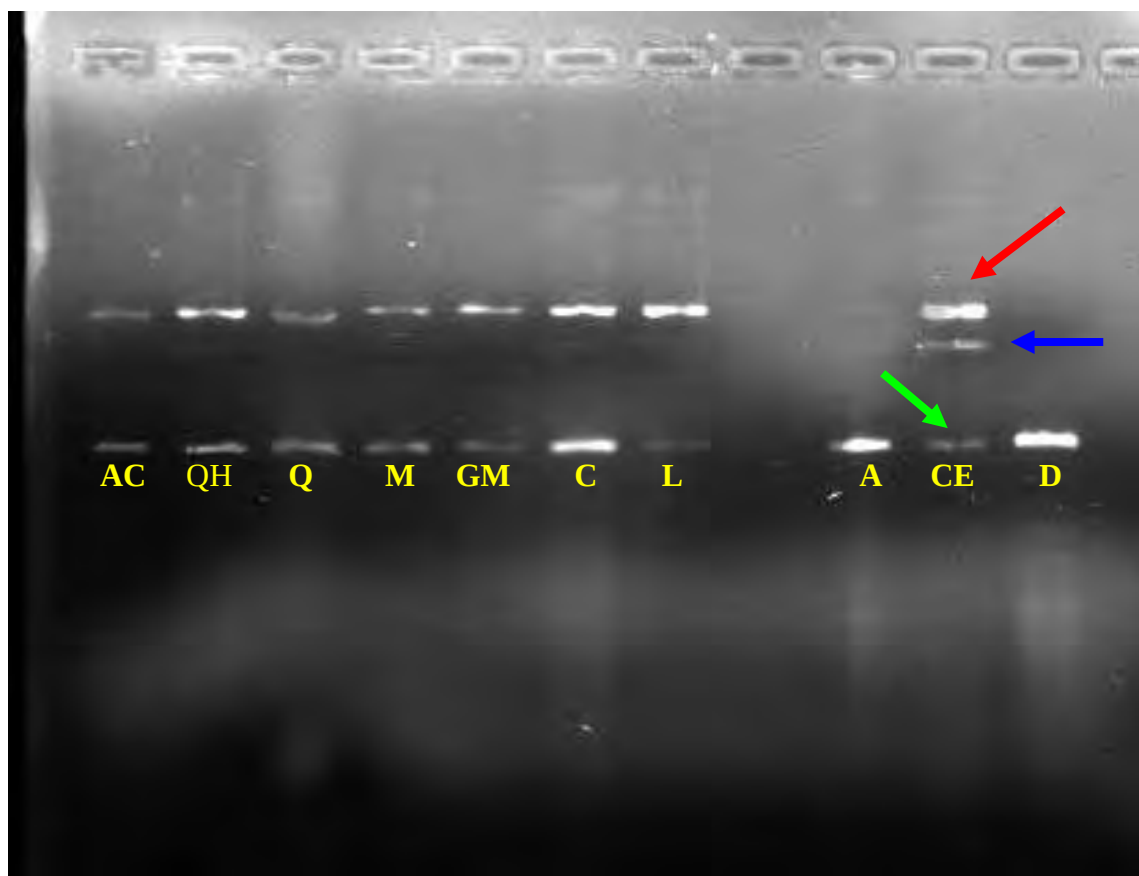


Figura 28. Gel do teste antimutagênico das substâncias puras isoladas dos extratos na concentração de 0,9mg/mL.(A= água, D=DMSO, CE= cloreto de estanho, AG= ácido gálico, GM= galato de metila, Q= quercetina, QH= Quercetina-3-o- α -L-raminopiranosídeo, M= Miricetina-3-o- α -L-raminopiranosídeo, C= catequina, L= lupeol. Seta vermelha = DNA plasmidial em forma círculo aberto; seta azul = DNA plasmidial na forma linear; seta verde = DNA plasmidial em forma superenovelada.

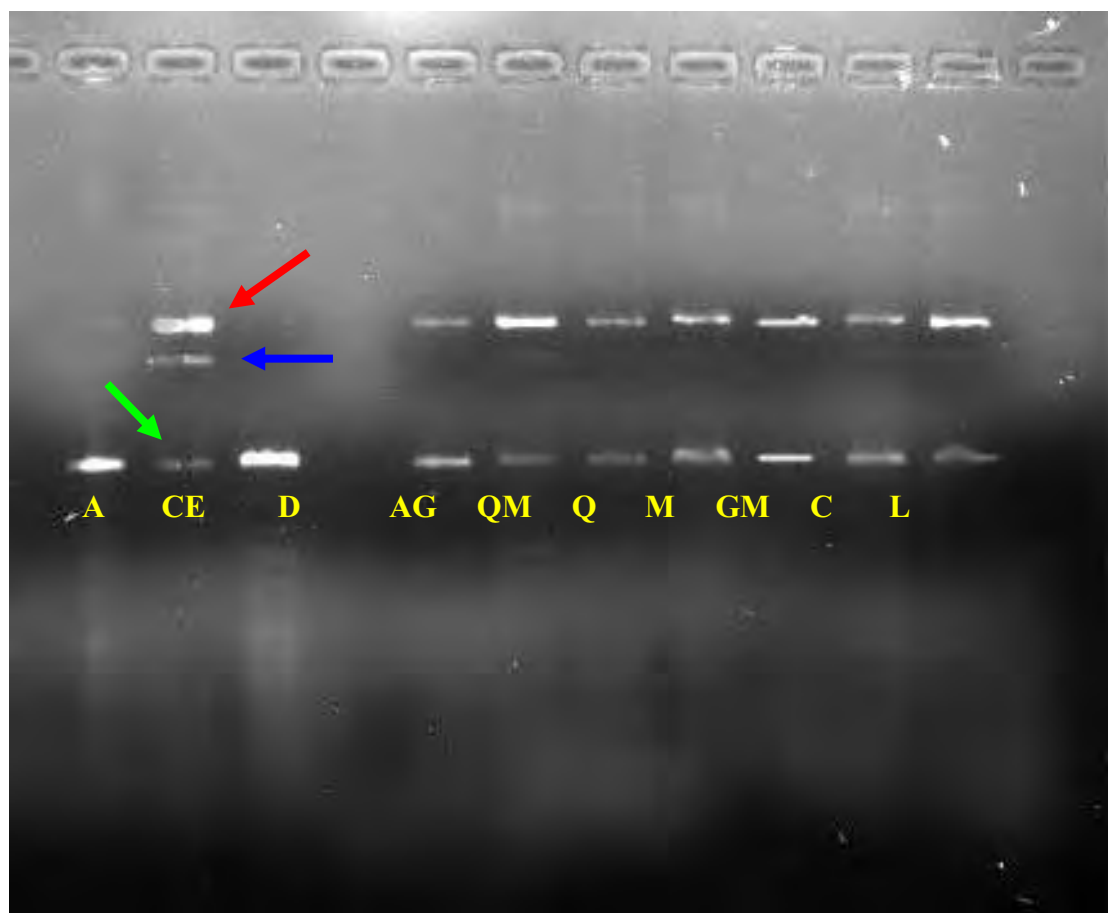


Figura 29. Gel do teste mutagênico das substâncias pura isoladas dos extratos na concentração de 0,45mg/mL.(A= água, D=DMSO, CE= cloreto de estanho, AG= ácido gálico, GM= galato de metila, Q= quercetina, QH= quercetina-3-O-a-L-arabinopiranosídeo, M= Miricetina-3-o- α - L-ramnopiranosídeo, C= catequina, L= lupeol. Seta vermelha = DNA plasmidial em forma circulo aberto; seta azul = DNA plasmidial na forma linear; seta verde = DNA plasmidial em forma superenovelada).

5. DISCUSSÃO

Com base nas informações da literatura e resoluções das agências regulamentadoras de novos produtos químicos e farmacológicos, neste estudo foram desenvolvidos o teste de Ames, micronúcleo e de danos no DNA plasmidial para avaliar o potencial mutagênico e antimutagênico de três espécies vegetais, a partir de quatro extratos: MeOH e CHCl₃ de *B. basiloba*, CHCl₃ de *B. crassa* e CHCl₃ de *D. elliptica* além das substâncias isoladas destes extratos: ácido gálico, galato-de-metila, quercetina-3-o- α -L-raminopiranosídeo, quercetina, miricetina-3-o- α -L-raminopiranosídeo, lupeol e catequina.

5.1- Extratos

Para melhor entendimento, a discussão foi separada por extrato e logo depois as substâncias puras apresentando os ensaios de mutagenicidade e em seguida os de antimutagenicidade, de acordo com as espécies estudadas.

Extrato MeOH de B.basiloba

Foram realizados testes *in vivo* e *in vitro* para verificar o potencial mutagênico do extrato MeOH de *B. basiloba*. De acordo com os resultados do teste *in vitro* em nenhuma das concentrações e linhagens utilizadas, o extrato induziu ao aumento do número de colônias revertentes de forma significativa (LIRA, et al. 2007 in press). Os resultados do teste *in vivo* estão mostrados na Tabela 14, onde não foi observado aumento no número de células micronucleadas quando se compara os grupos controle negativo com os grupos tratados com o extrato MeOH de *B. basiloba*, na concentração de 166mg/mL que é a concentração máxima de solubilidade do extrato no solvente utilizado. Portanto, fica evidenciado que nos sistemas testes utilizados e nas concentrações utilizadas o extrato não apresentou atividade mutagênica. Estes

resultados são relevantes, pois este estudo tem também como objetivo avaliar o potencial antimutagênico.

O estudo fitoquímico desse extrato está apresentado na Tabela 3. Dentre as substâncias encontradas temos a amentoflavona e a quercetina que na literatura são citadas como sendo mutagênicas (CARDOSO et al. 2006; MAKENA e CHUNG, 2007). As demais substâncias (compostos fenólicos e triterpenos) são citadas como não mutagênicas (RESENDE, et al, 2006; MAKENA e CHUNG, 2007).

De acordo com Cardoso et al. (2006) o extrato MeOH de *B. crassa* apresentou atividade mutagênica e a principal substância responsável por esse efeito foi a amentoflavona. Porém, em *B. intermedia* esse biflavonol presente em menor quantidade induziu apenas sinais de mutagenicidade (SANNOMIYA et al. 2007). Portanto, também em nosso caso, a quantidade de amentoflavona e quercetina presente no extrato não foi suficiente para induzir esse efeito e isso ficou confirmado através da quantificação dessas substâncias no extrato (LIRA et al. 2007, in press).

O potencial antimutagênico do extrato MeOH de *B. basiloba*, tanto *in vitro* quanto *in vivo* quando testado contra a ação de vários agentes indutores diretos e indiretos são mostrados nas Tabelas 1, 2, 15 e 16 e nas Figuras 6,7,8 e 22. Pode-se constatar que quando testado na linhagem TA97a em conjunto com os agentes mutagênicos este extrato foi citotóxico. Entretanto, observou-se uma redução em torno de 80% no número de colônias revertentes na linhagem TA98 frente à ação do NPD, e 82% quando testado em conjunto com B[a]P.

Através do estudo fitoquímico, nesse extrato foi detectada a presença de flavonóides tais como: catequina, miricetina, quercetina, entre outros, que são biologicamente ativos e abundantemente presente nos vegetais (DAS, 1990). Entre as atividades biológicas apresentadas pelos flavonóides pode-se destacar capacidade de seqüestrar radicais livres, anticonvulsivante, anticancerígeno, imunomodulador (DAS,

1990; PARK, et al., 2004) além de antiviral, antiinflamatório, antioxidante e atitumoral (ZUANAZZI e MONTANH, 2002. *apud* SIMÕES et al., 2004).

Em estudo desenvolvido através do teste de Ames utilizando a linhagem TA100 verificou-se que flavonóides isolados de *Rhus verniciflua* foram capazes de inibir a ação mutagênica da aflatoxina B1 (AFB1) e N-metil-N-nitro-N-nitrosoguanidina (MNNG) (PARK, et al., 2004). Os resultados obtidos em nosso trabalho de certa maneira concordam com os resultados obtidos por estes autores. Pois, em ensaios realizados com o extrato de *B. basiloba* frente a AFB1 também apresentaram redução no número de colônias revertentes por placa. Portanto, pode-se inferir que os flavonóides contribuíram para a redução no número de colônias revertentes.

Já é sabido que os flavonóides e outros compostos fenólicos como taninos, ácido gálico entre outros, apresentam propriedades antioxidantes, sendo que, os mecanismos de ação envolvidos neste processo são: neutralização de ânions superóxidos ($O_2^{\cdot -}$), radicais hidroxila ou radical peróxido atuando de forma sinérgica com vitaminas como a C e E. Alguns têm a capacidade de se ligar a íons metálicos impedindo a atuação deste íons como canalizadores na formação de radicais livres, inibição das enzimas ciclooxigenase, lipoxigenase, NADPH-oxidase, xantina-oxidase e fosfolipase, além de desenvolverem papel de estimuladores de enzimas com ação antioxidante como a catalase e a superóxido-dismutase. Deste modo, os flavonóides desenvolvem papel importante interferindo na formação e propagação de radicais livres (TRUEBA e SANCHEZ, 2001).

Alguns flavonóides como a quercetina e a miricetina apresentaram a capacidade de inibir a peroxidação microssomal de lipídeos (HARAGUCHI, 2001 in SIMÕES, et al., 2004).

Além dos flavonóides nesse extrato foram também encontrados triterpenos como ácido ursólico, ácido oleanólico, taninos entre outros.

Existe pelo menos cerca de 4000 triterpenóides na natureza sendo a maioria facilmente encontrada nos vegetais (KELLY et al., 2002; PATOCKA, 2003) e são várias as propriedades atribuídas aos triterpenos como: antiinflamatória, protetor do sistema vascular, antialérgica, analgésica. Entretanto, os triterpenos pentacíclicos são os que apresentam maior atividade anticancerígena como é o caso do ácido ursólico (AU), ácido oleanólico (AO) lupeol, ácido boswelico entre outros (LOPES, 2005).

Entre os vários compostos isolados, os ácidos ursólico e oleanólico são dois compostos que nos últimos anos vêm merecendo destaque na literatura devido às propriedades biológicas, como efeitos benéficos ao sistema cardiovascular apresentado em estudo realizado por Somova et al. (2003) e efeito imunomodulatório (Cárdenas et al. 2004). Além disso, foi relatada a capacidade de inibir a atividade da tirosina quinase, expressão da lipoxigenase, ciclooxigenase-2 (SUH et al., 1998; SUBBARAMAIAH et al., 2000; SHISHODIA et al., 2003).

Estudo realizado para avaliar o potencial antimutagênico do AO e AU através do teste de micronúcleo *in vivo*, demonstrou que tanto na forma isolada quanto em mistura, ambos foram capazes de reduzir o número de células micronucleadas, desenvolvendo ação protetora contra a ação da doxirrubicina (REZENDE et al., 2006).

Em outro estudo realizado com os ácidos ursólico e oleanólico, Niikawa et al. (1993), utilizando teste de Ames também obtiveram resultados positivos para inibição do potencial mutagênico do B[a]P na linhagem TA98. Os resultados obtidos neste estudo corroboram com os resultados obtidos pelo autores citados.

Além disso, em trabalho realizado com outros triterpenóides (α -amirina e β -amirina), através do teste do micronúcleo em camundongos, não evidenciaram atividade mutagênica (VILLASEÑOR et al., 2004). Pelo contrário, vários trabalhos revelam atividades biológicas bastante promissoras para esses compostos como antimutagenicidade (RESENDE et al., 2006) e atividade antitumoral (FUKUDA et al.,

2006). Ainda em relação aos triterpenoides, em estudo desenvolvido também com a mistura (α -amirina e β -amirina), constatou-se efeitos hepatoprotetores (OLIVEIRA et al., 2005).

Os resultados obtidos no teste do micronúcleo mostraram que o extrato metanólico, também apresentou atividade antimutagênica contra a ação da ciclofosfamida associada às duas menores concentrações (50 e 75 mg/mL) testadas, este potencial antimutagênico observado nos teste *in vivo* também foi observado no teste *in vitro*, visto que no teste de Ames, este extrato apresentou o mesmo comportamento frente a vários agentes mutagênicos, mostrando a eficiência na proteção do DNA a diferentes indutores de danos.

Extrato CHCl₃ de *B. basiloba*

Os testes com *Salmonella* para avaliação do potencial mutagênico deste extrato não apresentaram resultados positivos em nenhuma das linhagens testadas com ou sem ativação metabólica (LIRA et al.2007 in press) da mesma maneira, não foi observada atividade mutagênica no teste de micronúcleo.

A avaliação do potencial antimutagênico deste extrato mostrou que frente aos agentes mutagênicos NPD e AZS, ocorreu uma redução significativa no número de colônias revertentes, sendo obtidos os melhores resultados nas linhagens TA97a onde foram alcançados índices de redução de até 78%. Para a linhagem TA98 o maior índice de redução foi de 61% para maior concentração utilizada quando testado em conjunto com o NPD. Também foi eficiente quando testado na maior concentração nas linhagens TA 100 frente a AZS e TA102 em teste conjunto com a MC obtendo-se índices de redução de 79% e 66 % respectivamente.

Nos testes com mutágenos indiretos o extrato mostrou-se eficiente quando testado frente às linhagens TA97a e TA98 em associação com B[a]P. Quando testado em conjunto com a AFB1, ocorreu redução apenas na linhagem TA98. Para a associação deste extrato com o H₂O₂, pode-se observar que o extrato foi capaz de interagir com este composto reduzindo o seu potencial oxidativo.

No teste de micronúcleo este extrato não apresentou atividade mutagênica. Porém, apresentou atividade protetora nas duas menores concentrações utilizadas confirmado o potencial antimutagênico do extrato tanto *in vivo* quanto *in vitro*.

De acordo com os dados da Tabela 6, que mostra o perfil químico do extrato CHCl₃ de *B. basiloba*, a maioria das substâncias encontradas são comuns ao extrato MeOH (Lupeol, ác. ursólico, ác. oleanólico, catequina, ác. gálico e galato de metila) e como descrito anteriormente possuem atividade antimutagênica.

Estudo realizado com extrato aquoso de *Baccharis coridifolis* verificou-se atividade antioxidante atribuída à presença neste extrato de flavonóides e polifenóis (MONGELLI et al., 1997).

Foi atribuído aos triterpenos o potencial antimutagênico do extrato de *Melampodium divaricatum* em testes realizado com as linhagens de *S. tiphyimurium* TA97a, TA98, TA100 e TA102 frente ao B[a]P, AFB1 e Daunomicina (NOGUEIRA, et al., 2006). Nossos resultados vêm reforçar as propriedades antimutagênicas dos triterpenoides que também foram isolados deste extrato, facilitando o entendimento dos resultados obtidos tanto nos testes de mutagenicidade para os quais mostrou-se negativo, quanto para o teste de antimutagenicidade onde foram obtidos bons resultados na inibição da ação mutagênica de B[a]P e da AFB1.

Quando avaliado através do teste de micronúcleos o extrato CHCl₃ de *B. basiloba*, foi eficiente na proteção do DNA frente a ação da ciclofosfamida apenas nas duas menores concentrações, sendo capaz de reduzir o número de células

micronucleadas. Entretanto, para a maior concentração utilizada não foi possível observar redução no número de células micronucleadas.

Extrato CHCl₃ de *B. crassa*

O extrato CHCl₃ de *B. crassa* foi avaliado quanto ao seu potencial mutagênico e antimutagênico através dos testes de Ames e micronúcleos e os resultados mostram que no teste de Ames não foi observada atividade mutagênica (CARDOSO, et al., 2006). No teste do micronúcleo nas condições experimentais utilizadas também verificou-se ausência de efeito mutagênico.

De acordo com a composição química desse extrato, duas substâncias são relevantes quanto a sua atividade mutagênica, a amentoflavona e a quercetina.

Cardoso et al. (2006) afirmam que em testes realizados com o extrato metanólico de *B. crassa* foi observado mutagenicidade, e esse efeito foi atribuído ao biflavonol amentoflavona. Entretanto, no extrato CHCl₃ a presença da amentoflavona não foi suficiente para desenvolver atividade mutagênica, provavelmente pela quantidade que deve ser maior no extrato metanólico.

Outro aspecto que deve ser considerado é que, apesar do extrato clorofórmico de *B. crassa* apresentar quercetina, ela esta na sua forma glicosilada (Tabela 9) e de acordo com Heim et al. (2002), a quercetina no estado glicosilado tem sua reatividade reduzida o que pode justificar a ausência de mutagenicidade observada para este extrato.

Em estudo desenvolvido por Ramos et al., (2001) foi avaliado o potencial mutagênico do extrato de *Parthenium hysterophorus* L. através dos testes de Ames e micronúcleo em células da medula óssea de ratos e verificaram através dos dois testes a

ausência de mutagenicidade. Esta ausência de mutagenicidade foi atribuída à presença no extrato de flavonoides e triterpenos o que de certa maneira contribuem para esclarecer a ausência de atividade mutagênica dos extratos avaliados neste.

Diante dos resultados negativos obtidos nos teste de mutagenicidade do extrato CHCl_3 de *B. crassa* foram realizados testes para avaliar o seu potencial antimutagênico. Os resultados obtidos através do teste de Ames estão apresentados nas Tabelas 7 e 8 e Figuras de 13-16. De acordo com os dados observados, fica evidente que este extrato apresentou um bom potencial antimutagênico principalmente quando testado contra mutágenos indiretos, na linhagem TA98 com redução que chega a 95% quando associado ao B[a]P.

No teste de micronúcleos em sangue periférico de camundongos os dados mostram que só houve redução no número de células micronucleadas para a maior concentração (125mg/mL).

No perfil fitoquímico do extrato CHCl_3 de *B. crassa* constatou-se a presença de vários compostos como ácidos fenólicos, flavonóides, esteróides entre outros que, como já foi discutido anteriormente, apresenta atividade antimutagênica. Além disso, foi verificado a presença de ácido úrsólico, que é classificado como triterpenóide e nos últimos anos vem crescendo o interesse por esta classe de compostos graças às suas atividades terapêuticas como antiinflamatória (OVESNA et al., 2004; MICELI et al., 2005), antimicrobiana (NGOUELA et al., 2005), hepatoprotetora (JEONG et al., 2005), anti-alérgica (RYU et al., 2000; BANNO et al., 2004), anti-úlceras (OVESNA et al., 2004) e atividade antimutagênica (RESENDE et al., 2006).

A atividade antimutagênica observada por Resende et al. (2006) através do teste de micronúcleo embasam os dados obtidos na atividade antimutagênica obtidos neste estudo. Além disso, a presença de outros triterpenoides e flavonóides favorece a

redução do potencial mutagênico de indutores de danos o que foi verificado na literatura com discutido anteriormente.

Os dados da literatura indicam que os compostos fenólicos são capazes de reduzir a atividade mutagênica de agentes indutores de mutação. Hour et al. (1999) verificaram através do teste de Ames o potencial antimutagênico de alguns compostos fenólicos isolados de vários tipos chás, entre eles, chá verde e chá preto e verificaram que o ácido gálico e (-)epigallocatequina-3-galato foram capazes de reduzir o número de colônias revertentes contra ação de vários agente indutores.

Extrato CHCl₃ de *D. elliptica*

O potencial mutagênico do extrato CHCl₃ de *D. elliptica* foi avaliado através de testes *in vitro* e *in vivo* onde foi verificado que na maioria dos testes, este extrato não demonstrou atividade mutagênica. Os resultados do teste de Ames estão demonstrados na Tabela 10 e Figura 17, e pode-se verificar que este extrato não apresentou mutagenicidade quando testado sem metabolização, da mesma maneira não se apresentou como mutagênico para maioria das linhagens quando testado com metabolização. Entretanto, quando se observa o resultado obtido para duas menores concentrações na linhagem TA98 com S9, verifica-se um aumento no número de colônias revertentes e neste caso, o aumento observado no número de colônias pode ser classificado como mutagênico, pois, a razão de mutagenicidade é maior que dois.

Para o teste de micronúcleo em sangue periférico de camundongo este extrato não apresentou potencial mutagênico (Tabela 14). Este resultado pode ser explicado em parte, pela análise fitoquímica deste extrato, mostrada na Tabela 13. Analisando os dados da tabela podemos verificar que, assim como os outros extratos utilizados neste estudo, a composição química mostra substâncias que, segundo a

literatura, possuem propriedades protetoras contra danos causados ao DNA. Entretanto, pode-se observar a presença de quercetina, que no teste do micronúcleo não se comportou como agente mutagênico.

Segundo Borstel et al. (1998), alguns compostos que possuem atividade antimutagênica podem também, dependendo das condições experimentais, apresentarem-se como compostos mutagênicos. Esses compostos são conhecidos com compostos Janus, e alguns dos flavonóides encontram-se classificados nesta categoria, como é o caso da quercetina.

Os resultados dos testes de antimutagenicidade realizados através do teste de Ames estão apresentados nas Tabelas 11 e 12, e nas Figuras de 18-21 onde, pode-se verificar que na maioria dos casos este extrato apresentou atividade antimutagênica. Trabalhos na literatura realizados com ácidos fenólicos, flavonóides e triterpenóides indicam na maioria dos casos efeitos protetores para o DNA, desenvolvendo funções como antioxidantes, moduladores da atividade protéica *in vitro* (SHIMIZU, et al. 2004).

Shimizu et al. (2004) verificaram que ácidos fenólicos provenientes da própolis brasileira tem a capacidade de inibir danos oxidativos do DNA em hepatócitos (HepG2) e em linhagens de células provenientes de adenocarcinoma de cólon em humanos.

Em recente estudo com extrato *Melampodium divaricatum* realizado através do teste de Ames, foi verificado o potencial antimutagênico frente aos mutágenos AFB1, B[a]P e Daunomicina, demonstrando a atividade antimutagênica deste extrato. O potencial antimutagênico deste extrato foi atribuído à presença de triterpenóides em sua composição química (NOGUEIRA et al., 2006).

Soobrattee et al. (2005) em estudo com alguns compostos fenólicos constataram que a catequina, miricetina, quercetina entre outros, possuem propriedade

antioxidativa e que essa atividade pode estar ligada à capacidade de modular a expressão gênica, seqüestrar radicais livres ou quelar íons metálicos.

De um modo geral os resultados obtidos neste estudo mostraram através dos testes de antimutagenicidade tanto *in vivo* quanto *in vitro* que os extratos aqui estudados apresentaram ampla atividade protetora contra danos causados ao DNA por diversos agentes químicos indutores. O estudo fitoquímico mostrou que a maioria das substâncias presentes tem histórico de proteção e não de agressão ao DNA.

Portanto, na tentativa de relacionar o efeito antimutagênico observado com alguma das substâncias presentes nos extratos, foram realizados ensaios através do teste de Ames, direcionado para apenas uma das linhagens, a TA98. Além desse teste, foi também realizado o ensaio que envolveu a avaliação do DNA plasmidial frente aos diferentes tratamentos, já que experimentos *in vivo* não poderiam ser realizados devido a quantidade dessas substâncias ser insuficiente.

5.2 Substâncias Isoladas

Basicamente o metabolismo vegetal encontra-se dividido em duas vias, uma primária e a outra secundária. O metabolismo primário é direcionado para manutenção da atividade vital, como produção de energia e biossíntese de substâncias necessárias à sobrevivência (macromoléculas celulares) (SANTOS, in SIMÕES et al., 2004).

Os vegetais também apresentam a capacidade de produzir e armazenar inúmeras substâncias que são classificadas pelos bioquímicos como sendo do metabolismo secundário, cujo produto não é considerado essencial para o organismo produtor, mas fornece-lhe vantagens que ajudam na perpetuação da espécie (WINK, 1990).

Ainda segundo Gottlibe et al. (1996), uma outra definição mais simplificada para diferenciar os dois tipos de metabolismos apresentados pelos vegetais, seria que, o vegetal utiliza o metabolismo primário para produção de matéria-prima e de energia e o metabolismo secundário, é destinado a produção de metabólitos especial.

Durante muito tempo acreditou-se que estes compostos gerados a partir do metabolismo secundário eram produtos de excreção. Entretanto, hoje se sabe que são graças a estes compostos produzidos pelo metabolismo secundário que alguns vegetais se adaptam ao seu meio, pois são atribuídas atividades como proteção contra raios UV, defesa contra herbívoros entre outras (WINK 1990).

Os vegetais produzem uma grande diversidade de compostos tidos como secundários, tanto em relação ao número de substâncias quanto à diversidade numa mesma espécie (HARBONE 1998).

Um exemplo da capacidade de produção de compostos secundários pelos vegetais é da *Catharanthus roseus* (L.) G.Don. (vinca), da família *Apocynaceae*, que produz e acumula cerca de 90 compostos classificados como alcalóides (ROBBERS et al., 1996).

Estes compostos secundários vêm sendo amplamente estudados principalmente na área farmacêutica (SANTOS in SIMÕES et al., 2004).

As substâncias isoladas dos extratos utilizados neste estudo são consideradas compostos secundários, pois os triterpenóides e esteróides são originados através da via da biossíntese do acetato enquanto que os compostos fenólicos como é o caso dos flavonóides e taninos são produzidos através da via da biossíntese do ácido chiquímico (SANTOS in SIMÕES et al., 2004).

Após a realização do estudo fitoquímico dos extratos, algumas substâncias foram submetidas à avaliação do potencial mutagênico e antimutagênico através do teste de Ames e de danos no DNA plasmidial.

Para a avaliação no teste de Ames foi selecionada a linhagem TA98, já que foi a linhagem que apresentou os melhores resultados de antimutagenicidade frente aos agentes mutagênicos diretos e indiretos. As substâncias isoladas do extrato foram escolhidas obedecendo apenas o critério de rendimento após o processo de extração. As substâncias testadas e os extratos de onde foram isolados estão mostrados na Tabela 19.

Tabela 19. Substâncias puras avaliadas e os extratos de origem.

Substância isolada	Extrato
Ácido gálico	<i>CHCL₃</i> de <i>B. crassa</i> , MeOH de <i>B. basiloba</i> , <i>CHCL₃</i> de <i>B. basiloba</i> , <i>CHCL₃</i> de <i>D. elliptica</i>
Galato de metila	<i>CHCL</i> de <i>B. crassa</i> , MeOH de <i>B. basiloba</i> , <i>CHCL₃</i> de <i>B. basiloba</i> .
Quercetina	<i>CHCL₃</i> de <i>D. elliptica</i>
Quercetina-3-O- α -L-arabinopiranosídeo	<i>CHCL</i> de <i>B. Crassa</i> , <i>CHCL₃</i> de <i>B. basiloba</i> .
Miricetina-3-o- α -L-raminopiranosídeo	<i>CHCL₃</i> de <i>D. elliptica</i>
Catequina	<i>CHCL₃</i> de <i>B. crassa</i> , MeOH de <i>B. basiloba</i> , <i>CHCL₃</i> de <i>B. basiloba</i> .
Lupeol	<i>CHCL₃</i> de <i>B. basiloba</i> , <i>CHCL₃</i> de <i>B. crassa</i> , MeOH de <i>B. basiloba</i> .

Quercetina

Os resultados dos testes de Ames e do plasmídeo realizado com as substâncias isoladas para verificar o potencial mutagênico dos compostos estão apresentados na Tabela 17 e Figura 26. Pode-se observar que apenas a quercetina apresenta-se como mutagênica, os demais compostos não apresentaram potencial mutagênico.

Entretanto, em estudo realizado por Snijman et al. (2007), verificaram através do teste de Ames, que alguns flavonóides entre eles a quercetina, foram capazes de expressar atividade antimutagênica contra ação da AFB1 e 2-acetamido-fluoreno (2-AAF) e ação mutagênica, estes resultados obtidos foram atribuídos entre outros aspectos à concentração utilizada. Isto sugere que no caso deste estudo a mutagenicidade também pode ser atribuída principalmente a quantidade.

Ainda em relação à atividade mutagênica destes compostos isolados, os mecanismos foram avaliados através do teste do plasmídeo onde foi observado que apenas a quercetina apresentou efeito lesivo, pois foi a única substância capaz de promover a quebra do DNA plasmidial alterando a sua conformação de superenovelada para círculo aberto, quando utilizada na concentração de 0,9mg/mL.

Os resultados deste estudo com substâncias isoladas de plantas estão de acordo com os obtidos por Cardoso et al (2006), que também analisaram algumas substâncias puras, mas apenas a quercetina na sua forma aglicona e a amentoflavona apresentaram atividade mutagênica. Verificaram ainda que tanto derivados glicosilados de quercetina quanto o galato de metila não apresentaram atividade mutagênica, o que reforça os resultados obtidos no presente estudo.

Além disso, outros autores também relatam a atividade mutagênica da quercetina. Segundo Macgragor (1983), a quercetina induz lesões do tipo *frameshift* e substituição de pares de bases. Estudos revelam que a quercetina é um dos compostos do vinho tinto e que tem a capacidade de induzir lesões oxidativas no DNA (GASPAR et al. in SANTOS 2006).

Por se tratar de um flavonóide e como relatado acima, a quercetina também apresenta resultados na literatura que mostram a sua atividade antimutagênica, sendo capaz de reduzir os danos causados por compostos oxidativos como a bleomicina e o peróxido de hidrogênio (STAGOS et al.,2006).

Porém, nas condições experimentais utilizadas neste trabalho a quercetina não apresentou atividade antimutagênica.

Quercetina-3-o- α -L-hamnopiranosídeo

Como se pode observar através do teste de Ames a quercetina-3-o- α -L-raminopiranosídeo, não foi capaz de induzir mutação, o que está de acordo com a afirmação de Heim et al (2002), que a quercetina na sua forma glicosilada fica menos reativa, perdendo assim, a capacidade de interação com o DNA e promover danos ao material genético.

Neste trabalho a quercetina glicosilada apresentou atividade antimutagênica ainda que moderada diante do NPD. Entretanto, esta atividade foi perdida quando foi testada de forma indireta, ou seja, com a utilização de S9, o que está de acordo com resultados obtidos por Tangvarasittichai et al. (2007), que observaram em seus estudos que a quercetina e outros flavonóides na sua forma glicosilada foram capazes de reduzir danos causados por AFB1 e B[a]P.

No teste de genotoxicidade esta substância não promoveu interação com o DNA plasmidial a ponto de promover danos. Quando testado em conjunto com o CE apresentou redução de apenas aproximadamente (58%) no número de quebras como mostrado na Figura 27.

Ainda em relação a atividade biológica da quercetina na sua forma glicosilada, Dongmo et al., (2007), observaram em seus estudos que alguns flavonóides entre eles a quercetina apresentou atividade antiinflamatória, inibindo as cicloxigenases COX-1 e COX-2.

Ácido gálico

A literatura traz relatos que o ácido gálico é um agente antimutagênico, Gichner et al. (1986, 1987) mostraram que o ácido gálico foi antimutagênico

combatendo os danos causados pelo N-metil-N'-nitro-N-nitroso-guanidina (MNNG). Em testes com a linhagem TA100 foram obtidos bons resultados na avaliação contra o potencial mutagênico do 3-(5-nitro-2-furil)ácido acrílico (5NFAA) e da azida sódica (BIROŠOVÁ et al. 2005).

Em nosso estudo foram obtidos resultados que estão de acordo com a literatura, pois, o ácido gálico apresentou redução de aproximadamente 78% no número de quebras induzidas pelo CE e sendo uma das substâncias mais ativas.

Os compostos fenólicos vem há muito tempo sendo investigados quanto às suas atividades terapêuticas, entre elas ação antioxidante, capacidade de seqüestrar radicais livres, capacidade quelante de íons metálicos e modulação da expressão gênica (SOOBATTREE et al., 2005).

Miricetina-3-o- α - L-raminopiranosídeo

Alguns dados da literatura relatam que a miricetina aglicona é capaz de promover quebras ao DNA (YOSHINO et al., 1999). Entretanto, Santos (2006) avaliou um derivado deste composto na sua forma glicosilada, ou seja, associado a um açúcar e verificou-se a ausência de mutagenicidade, os dados obtidos neste trabalho estão de acordo com obtidos por este autor. No teste de Ames aqui realizado, a sua ação contra o agente indireto não foi tão eficaz, apresentando apenas uma baixa atividade protetora reduzindo em apenas 42% atividade mutagênica do NPD e quando testado na presença de S9 esta proteção caiu para 26%.

Observando os dados expostos nas Figuras 27, 28 e 29, vê-se que a maioria das substâncias isoladas apresentaram atividade protetora contra a ação do cloreto de estanho. Na Figura 27 onde são mostrados os percentuais de quebras, fica claro que a concentração de 0,9mg/ml foi mais eficiente, pois apresentou melhores

resultados para cinco compostos e em apenas dois compostos miricetina-3-o- α - L-raminopiranosídeo e catequina o efeito protetor foi melhor na menor concentração testada.

No teste do plasmídeo esta substância também não apresentou atividade genotóxica, portanto, não foi capaz de promover danos ao DNA. Quando testada contra a ação genotóxica do CE, foi capaz de reduzir o número de quebras do DNA plasmidial (em 35%).

Galato de Metila

Nos testes de avaliação do galato de metila não foi observada atividade mutagênica. Este resultado está de acordo com Santos (2006) e com os resultados obtidos por Martinez et al. (2000) que avaliaram o galato de metila não verificando atividade mutagênica para esta substância.

O galato de metila faz parte dos compostos fenólicos e como já discutido anteriormente possui várias propriedades biológicas principalmente a ação antioxidante e, além disso, tem sido atribuído aos compostos fenólicos um papel importante na prevenção de câncer e doenças cardíacas (MARIA et al., 2005).

Neste trabalho quando avaliado na ausência de S9 o galato de metila apresentou atividade antimutagênica discreta (42%), esse percentual de redução caiu quando esta substância foi avaliada na presença do S9.

No teste do plasmídeo também não foi observado mutagenicidade. Mas, o galato de metila foi capaz de reduzir os danos causado ao DNA pelo CE, reduzindo o percentual de quebras (40,13%).

Lupeol

O interesse pelas atividades biológicas dos vários triterpenóides vem aumentando a cada dia e entre as várias propriedades dos triterpenos estão incluídas propriedades como imunoestimulador (PRESS et al. 2000, *apud* CONNOLLY e HILL, 2002); antiinflamatória (RIOS et al. 1998, *apud* Connolly e Hill, 2002) e atividade antipromoção de tumores (KONOSHIMA e TAKASAKI, 2001 *apud* CONNOLLY e HILL, 2002).

Lupeol é um triterpenóide muito comum em vários frutos, vegetais e plantas medicinais, sendo encontrado em quantidades significantes principalmente em azeitona, manga, morango e figo (SALEEM et al., 2004).

O lupeol tem sido empregado com sucesso na terapia de carcinoma de cabeça e pescoço, sendo capaz de induzir células a apoptose. Acredita-se que o lupeol tem ação na regulação de células NF-kappa β (LEE et al., 2007).

Em estudo realizado com extrato etanólico e algumas frações de *Plumeria acuminata* Ait, foi verificado que, juntamente com os ácidos ursólico e oleanólico, o lupeol promoveu redução no número de micronúcleos induzidos por mitomicina C, sendo o lupeol responsável por uma redução de 57% no número de células micronucleadas (GUEVARA et al., 1996). Este estudo é corroborado pelos resultados obtidos nos teste realizado com lupeol para verificar o seu potencial mutagênico e antimutagênico. Ficou constatado também que esse triterpeno não foi capaz de promover danos ao material genético quando testado através do teste de Ames e do plasmídeo. Os resultados da avaliação antimutagênica mostraram que o lupeol no teste de Ames foi mais eficiente quando testado contra ação de agentes diretos como mostra a Tabela 18, já na avaliação do teste do plasmídeo quando o lupeol foi utilizado

na menor concentração como mostrado na Figura 27, foi protetor frente contra lesões induzidas pelo cloreto estanhoso.

Catequina

A catequina e seus derivados são classificados como taninos condensados e assim como vários outros taninos da mesma classe são encontrados nos vegetais. Os vegetais ricos em taninos são amplamente empregados na medicina popular no tratamento de enfermidades como diarreia, hipertensão arterial, reumatismo, hemorragia, feridas, queimaduras, problemas estomacais (azia, náusea, gastrite, e úlcera gástrica) problemas renais, do sistema urinário e processos inflamatórios em geral (HASLAM 1996; DE BRUYNE et al. 1999; DU FRESNE E FARNWORTH, 2001 *apud* SIMÕES et al., 2004).

Testes realizados com extratos ricos em taninos apresentaram *in vitro* várias atividades biológicas como ação bactericida e fungicida (SCALBERT 1991; CHUNG et al., 1998), antiviral (OKUDA et al., 1998); inibição da peroxidação de lipídeos e seqüestrador de radicais livres (HAGERMAN et al., 1998; MOURE et al., 2001) além de antitumoral (DUFRESNE e FARNWORTH 2001).

Segundo Santos e Mello, 2003 *apud* Simões (2004) o mecanismo antioxidante dos taninos está diretamente ligado a capacidade de seqüestrar radicais livres. Ainda de acordo com Moure et al. (2001) várias doenças de caráter degenerativo como câncer, esclerose múltipla, aterosclerose são doenças que estão ligadas a altas concentrações intercelulares de espécies oxigenadas reativas ou radicais livres. Vários taninos atuam como capturadores de radicais livres e poderiam ser utilizados de forma eficaz no tratamento destas enfermidades, interceptando o oxigênio ativo formando radicais estáveis. Este processo poderia se dar ocorrer bloqueio da peroxidação de

lipídeos em mitocôndrias hepáticas ou no bloqueio da lipoxigenases em leucócitos. Desta maneira, os taninos como a catequina teriam uma possível importância na prevenção e tratamento de doenças originadas pela peroxidação de lipídeos.

Estes relatos vêm corroborar com os resultados obtidos nos teste de mutagenicidade e antimutagênicidade desenvolvidos neste estudo onde foi constatado que a catequina não apresentou atividade mutagênia no teste de Ames e nem no teste do plasmídeo. Quanto à avaliação do potencial antimutagênico desta substância foi evidente a sua ação protetora tanto no teste de Ames quando testado de forma direta, ou seja, sem ativação metabólica atingindo a uma redução de 52% no número de colônias revertentes. Quando avaliada através do teste do plasmídeo nas duas concentrações utilizadas este tanino apresentou atividade protetora contra ação do cloreto de estanho.

6. CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos neste estudo as seguintes conclusões foram obtidas.

- Os extratos de maneira geral não apresentaram atividade mutagênica na maioria das condições experimentais utilizadas tanto *in vitro* quanto *in vivo*.
- A atividade antimutagênica do extrato MeOH de *B. basiloba* foi maior quando testado na linhagem TA98, alcançando 82% de redução no número de colônias revertentes contra a ação da Aflatoxina B1 que é um agente intercalante e pode promover danos do tipo *frameshit*.
- O Extrato CHCl₃ de *B. basiloba* também apresentou atividade antimutagênica, e assim como para o extrato metanólico da mesma espécie, os melhores resultados foram obtidos na TA97a com 78% de redução no número de colônias revertentes frente ao NPD e ao B[a]P.
- O extrato clorofórmico de *B. crassa* apresentou potencial antimutagênico e os maiores índices de redução (≈90%) foram obtidos com a linhagem TA98 frente ao B[a]P.
- De todos os extratos avaliados na TA102, que detecta principalmente danos oxidativos, o extrato CHCl₃ de *B. crassa* foi o mais efetivo agente antioxidante.
- Nos testes realizados com extrato CHCl₃ de *D. elliptica*, observou-se atividade antimutagênica contra a ação do NPD na linhagem TA98 com redução de 95% frente ao B[a]P.
- *In vivo* todos os extratos avaliados foram capazes de minimizar o efeito mutagênico da ciclofosfamida, porém, os melhores resultados foram obtidos com o extrato CHCl₃ de *D. elliptica* (51,88%) e metanólico de *B. basiloba* (49,66%).

- As respostas quanto à antimutagenicidade de extratos e substâncias puras foram diferentes, tendo sido mais pronunciadas para os extratos, o que sugere a interação entre substâncias.
- A avaliação das substâncias puras obtidas dos extratos mostrou que a quercetina pode promover interação com DNA causando mutação as demais substâncias isoladas não apresentam atividade genotóxica.
- No teste com o plasmídeo, a maioria das substâncias apresentou potencial antimutagênico, impedindo a interação do CE com DNA, e diminuindo a ocorrência de quebras, o que sugere atividade antioxidativa.

7.REFERÊNCIAS

AJITH TA, SOJA M. A comparative study on the antimutagenicity of atorvastatin and lovastatin against directly acting mutagens. **Cell Biology Toxicology**. v. 22(4) p.269-74. 2006.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. Molecular Biology of the Cell. **New York: Garland Science**, 2002.

AMARQUAVE A, CHE CT, BEJAR E, MALONE MH, FONG HH. A new glycolipid from *Byrsonima crassifolia*. **Planta Medica**. v. 60(1)p. 85-6. 1994

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

ANDERSON, W.R. Floral conservatism in neotropical Malpighiaceae. **Biotropica**, v.11, p.219-223. 1979.

ANDRADE, S.F. CARDOSO, L.G.V. CARVALHO, J.C.T. BASTOS, J.K.. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of extract, fractions and populnoic acid from bark wood of *Austroplenckia populnea*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 109,p. 464–471, 2007.

AZEVEDOA, L.; GOMES, J.C.; STRINGHETAB, P.C.; GONTIJOC, A' .M.M.C.; PADOVANID, C.R.; RIBEIROE, L.R.; SALVADORI, D.M.F. Black bean (*Phaseolus vulgaris* L.) as a protective agent against DNA damage in mice. **Food and Chemical Toxicology**, v. 41, p. 1671–1676, 2003.

BANNO, K.; SUSUMU, N.; HIRAO, T.;, YANOKURA, M.; HIRASAWA, A.; AOKI, D.; UDAGAWA, Y.; SUGANO, K.; NOZAWA, S. T. wo Japanese kindreds occurring endometrial cancer meeting new clinical criteria for hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC), Amsterdam Criteria II. *J Obstet Gynaecology Research*, v.30(4), p.287-92. 2004

BASSO, L. A.; SILVA, L. H. P.; FETT-NETO, A. G.; JUNIOR, W. F. A.; MOREIRA, I. S.; PALMA, M. S.; CALIXTO, J. B.; FILHO, S. A.; SANTOS, R. R.; SOARES, M. B. P.; SANTOS, D. S. The use of biodiversity as source of new chemical entities against defined molecular targets for treatment of malaria, tuberculosis, and T-cell mediated diseases – a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.100, 6, p. 575-606, 2005.

BIROŠOVÁ. L.; MIKULÁŠOVÁ. M.; VAVERKOVÁ, Š. Antimutagenic effect of phenolic acids. **Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacký**, Olomouc, Czechoslovakia. v.149(2), p.489–91. 2005.

BORBA, A. M.; MACEDO, E M. Plantas medicinais usadas para a saúde bucal pela comunidade do bairro Santa Cruz, Chapada dos Guimarães, MT, Brasil. **Acta botânica brasileiro**. V.20(4), p. 771-782. 2006.

BORSTEL, R.C. VON; HIGGINS, J. A Janus carcinogens and mutagens. **Mutation Research**, v. 402, p.321–329, 1998.

BUNKOVA, R., MAROVA, L., NEMEC, M., **Atimutagenic** properties of green tea. **Plant Food for Human Nutrition**, v.60, p. 25-29. 2005.

CACERES A, LOPEZ B, JUAREZ X, DEL AGUILA J, GARCIA S. Plants used in Guatemala for the treatment of dermatophytic infections. 2. Evaluation of antifungal activity of seven **American plants**. **Journal Ethnopharmacol.** v.40(3), p. 207-13. 1993.

CÁRDENAS, C.; QUESADA, A. R.; MEDINA, M.A.; Effects of ursolic acid on different steps of the agiogenic process. **Biochemistry Biophysics Research Commun**, v. 320, p. 402-408, 2004.

CARDOSO, C.R.P.; COLUS, I. M. DE 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.

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

CARINO-CORTES R, HERNANDEZ-CERUELOS A, TORRES-VALENCIA JM, GONZALEZ-AVILA M, ARRIAGA-ALBA M, MADRIGAL-BUJADAR E Antimutagenicity of *Stevia pilosa* and *Stevia eupatoria* evaluated with the Ames test. **Toxicology In Vitro.** v.21(4), p.691-697. 2007.

CHANG, L.C.; KINGHORN, A.D. Flavonoides as cancer chemopreventive agents. In TRIGALI, C. (ed.) bioactive compounds from natural source. **London: Taylor e Francis**, 2001.

CHOY, W. N. Regulatory Genetic toxicology test. **Genetic Toxicology and Cancer Risk Assessment**, p.93-113. 2001.

CHUNG, K. T. ; LU, Z.; CHO, M.W. Mechanism of inhibition of tannic acid and related compounds on the growth of intestinal bacteria. **Food and Chemical Toxicology**, v. 36, p.1053-1060. 1998.

COELHO, F. B. R.; DAL BELO, C. A.; LOLIS, S. F.; SANTOS, M. G. Levantamento etnofarmacológico realizado na comunidade Mumbuca localizada no Jalapão – to. **Revista Eletrônica de Farmácia**, Suplemento v. 2 (2), p.52-55, 2005

CONNOLLY J.D.; HILL, R. A.**Triterpenoids**. Natural Products Reports. v.19, p. 494-513 2002.

CORDELL JL.A guide to developing clinical pathways. **MLO Med Lab** v.27(4), p. 35-9. 1995.

CORRÊA, M. P. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Rio de Janeiro: **Ministério da Agricultura**, 1974. 132p.

CORTÉS-ESLAVA, J.; GÓMEZ-ARROYO, S.; VILLALOBOS-PIETRINI, R.; ESPINOSA-AGUIRRE. J. J. Antimutagenicity of coriander (*Coriandrum sativum*) juice on the mutagenesis produced by plant metabolites of aromatic amines. **Toxicology Letters**. v.153, p.283–292. 2004.

CSGMT. Micronucleus test with mouse peripheral blood erythrocytes by acridine orange supravital staining: The summary report of the 5th collaborative study by CSGMT/JEMS.MMS. **Mutation Research**, v.278, p. 83-98, 1992.

DANTAS, F. J.S.; MORAES, M. O.; MATTOS, J.C.P. DE; BEZERRA, R.J.A.C.; CARVALHO, E.F.; FILHO, M.B; ARAÚJO, A.C. DE. Stannous chloride mediates single strand breaks in plasmid DNA through reactive oxygen species formation. **Toxicology Letters**. v.110 p.129–136. 1999.

DAS, N. P.; (ed.) Flavonoids in Biology and Medicine, v. III, **National University of Singapore**, Singapore, 1990.

DE BRUYNE, T.; PIETERS, L.; DEELSTRA, H.; VLITINCK, A. J. Condensed vegetable tannins: biodiversity in structure and biological activities. **Biochemistry and Systematic Ecology**, v.27, p.445-459, 1999.

DE FLORA. S., D'AGOSTINI, F., MASIELLO, L., GIUNCIUGLIO, D., ALBINI, A., Synergism between N-acetylcysteine and doxorubicin in the prevention of tumorigenicity and metastasis in murine models. **International Journal Cancer** v.17, 67(6), p. 842-8. 1996.

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

DELMANTO, R. D.; LIMA, P. L. A.; SUGUI, M. M. A.; EIRA, F.; SALVADORI, D. M. F.; SPEIT, G.; RIBEIRO, L. R. Antimutagenic effect of *Agaricus blazei* Murrill

mushroom on the genotoxicity induced by cyclophosphamide. **Mutation Research** v.496, p.15–21. 2001.

DE MESQUITA, M.L. GRELLIER, A. P. MAMBU, B. L. DE PAULA, C. J.E. ESPINDOLA, D. L.S. In vitro antiplasmodial activity of Brazilian Cerrado plants used as traditional remedies. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 110, p. 165–170, 2007.

DICKEL, M.L.; RATES, S.M.K.; RITTER, M. R. Plants popularly used for losing weight purposes in Porto Alegre, South Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v.109,p. 60–71, 2007.

DONGMO, A. B.; MIYAMOTO, T.; YOSHIKAWA, K.; ARIHARA, S.; LACAILLE-DUBOIS, M. A. Flavonoids from *Acacia pennata* and their cyclooxygenase (COX-1 and COX-2) inhibitory activities. **Planta Medical**. v.73(11), p.1202-1207. 2007.

DUFRESNE, C. J.; FARNWORTH, E. R. A review of later research findings on health promotion properties of tea. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.12, p. 404-421. 2001.

Eiten, G. Delimitação do conceito de Cerrado. **Arquivos do Jardim Botânico**, Rio de Janeiro 21,p. 125-134, 1977.

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

FARAH, S. B. *Dna Segredos & Misterios* - 1ª ed. 2000, . 276p.

FIORIO R, VELLOSI R, BRONZETTI G. Effects of spermine on formation of HGPRT-mutants induced by ethylmethanesulfonate, methylmethanesulfonate, and mitomycin C in V79 Chinese hamster cells. **Environmental and Molecular Mutagenesis**. v.23(4), p. 94-8, 1994.

FUKUDA, M.; OHKOSHI, E.; MAKINO, M.; FUJIMOTO, Y. Studies on the Constituents of the Leaves of *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae) and their Cytotoxic Activity

Chemical & pharmaceutical bulletin. v.54(10), p. 1465—1468, 2006.

GASPAR, J.; LAIRES, A.; MONTEIRO, M.; LAUREANO, O.; RAMOS, E.; RUEFF, J. Quercetin and the mutagenicity of wines. **Mutagenesis**, v. 8, n. 1, p. 51-55, 1993.

GEETHA, T., GARG, A., CHOPRA, K., KAUR, I. P., Delineation Of Antimutagenic Activity Of Catechin, Epicatechin And Gree Tea Extract. **Mutation Research**, v.556, p. 65-74, 2004.

GICHNER, T.; VÉLEMINSKÝ, J.; RAPOPORT, I. A.; VASILIEVA, S.V. Antimutagenic effect of p-aminobenzoic acid on the mutagenicity of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in *Salmonella typhimurium*. **Mutation Research**. v.192(2), p.95-8, 1987.

GICHNER, T.; VELEMINSKY, J. Organic solvents inhibit the mutagenicity of promutagens dimethylnitrosamine and methylbutylnitrosamine in a higher plant *Arabidopsis thaliana*. **Mutagenesis**. v.1(2), p. 107-9, 1986.

GRAWÉ, J.; BRAMSSON-ZETTERBERG, L.; ZETTERBERG, G. Low dose effects of chemicals as assessed by the flow cytometric *in vivo* micronucleus assay. **Mutation Research**, v.405, p. 199-208, 1998.

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

GOTTLIEB, O.; KAPALN, M. A. C.; BORIN, M. R. M. B. Biodiversidade: um enfoque químico-biológico. Rio de Janeiro: **UFRJ**, 1996. 267p.

GUARALDO, L.; SERTIE J.A.; BACCHI, E.M. Antiulcer action of the hydroalcoholic extract and fractions of *Davilla rugosa* Poirlet in the rat. **Journal Ethnopharmacology**. v.76(2),p. 191-5. 2001.

GUEVARA, A. P.; AMOR, E.; RUSSELL, G. Antimutagens from *Plumeria acuminata* Ait. **Mutation Research**, v. 361, p. 67-72, 1996.

GUPTA, S.; SAHA, B.; GIRI A.K. Comparative antimutagenic and anticlastogenic effects of green tea and black tea: a review. **Mutation Research**, v.512, p. 37–65,2002.

HAGERMAN, A. E. Extracion of tannin from fresh and preserved leaves. **Journal of Chemistry and Ecology**, v.14, p. 453-461, 1988.

HARBONE, J. B. Introduction to ecological biochemistry. 3ed., London: **Academic**. 1988.

HASLAM, E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: Possible modes of action. **Journal of Natural Products**, v. 59, p. 205-215, 1996.

HASHIMOTO, K.; YANAGISAWA, T.; OKUI, Y.; IKEYA, Y.; MARUNO, M.; FUJITA, T. Studies on anti-allergic components in the roots of *Asiasarum sieboldi*. **Planta Medica**, v.60, 2, p. 124-127, 1994.

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

HEDDLE, J. A.; HITE, M.; KIRHART, B.; MACGREGOR, J. T.; NEWELL, G. W.; SALAMONE, M. F. The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. **Mutation Research**, v.123, p. 61-118, 1983.

HEIM, K. E.; TAGLIAFERRO, A. R.; BOBILYA, D. J.,. Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.13, 572–584, 2002.

HORN, R. C.; VARGAS, V. M. F. Antimutagenic activity of extracts of natural substances in the *Salmonella*/microsome assay. **Mutagenesis**. v.18, n.2 p.113–118, 2003.

HOYOS, L. S.; CARVAJAL, S.; SOLANO, L.; RODRIGUEZ, J.; OROZCO, L.; LÓPEZ, Y.; AU, W. W. Cytogenetic monitoring of farmers exposed to pesticides in Colombia. **Environmental Health Perspectives**, v. 104, p. 535-538, 1996

HOUR, T.C.; LIANG, Y.C.; CHU, I.S.; LI, J.K. Research Section Inhibition of Eleven Mutagens by Various Tea Extracts, (ÿ)Epigallocatechin-3-gallate, Gallic Acid and Caffeine **Food and Chemical Toxicology**, v.37, p. 569-579, 1999.

IBGE. **Mapa de vegetação do Brasil**. Rio de Janeiro: IBGE, 2004.

JEONG, M. T.; HO, C. T.; WANG, Z. Y.; FERRARO, T.; LOU, Y. R.; STAUBER, K.; MA, W.; GEORGIADIS, C.; LASKIN, J.D.; CONNEY, A.H. Inhibition of skin tumorigenesis by rosemary and its constituents carnosol and ursolic acid. **Cancer Research**, v.54, p. 701-708, 1994.

JUDD, W. S.; CAMPBELL, C. S.; KELLOGG, E. A. & STEVENS, P. F.. **Plant systematics, a phylogenetic approach**. Sinauer Assoc., Inc. Publishers, Sunderland, Massachusetts, USA. 1999.

JURADO, J.; ALEJANDRE-DURÁN, E.; ALONSO-MORAGA, A.; PUEYO, C. Study on the mutagenic activity of 13 bioflavonoids with the *Salmonella* ara test. **Mutagenesis**, v. 6, n. 4, p. 289-295, 1991.

KADA T, SHIMOI K. Desmutagens and bio-antimutagens--their modes of action. **Bioessays**. v.7(3), p.113-6. 1987.

KISHI, M.; HORIGUCHI, Y.; WATANABE, S.; HAYASHI, M. Validation of the mouse peripheral blood micronucleus assay using acridine orange supravital staining with urethane. **Mutation Research**, v.278, p. 205-208, 1992.

KLINK, C.A.; MACHADO, R.B. A conservação do Cerrado brasileiro **MEGADIVERSIDADE**,v.1, (1),p.147-155, 2005.

KOGAN G, RAUKO P, MACHOVÁ E. Fungal chitin-glucan derivatives exert protective or damaging activity on plasmid DNA. **Carbohydr Research**. v. 22; 338(9), p.931-5. 2003.

LABIENIEC, M.; GABRYELAK, T.; FALCIONI, G. Antioxidant and pro-oxidant effects of tannins in digestive cells of the freshwater mussel *unio tumidus*. **Mutation Research**, v. 539, p. 19-28, 2003.

LAKASHMI, B.; AJITH, T. A.; SHEENA, N.; GUNAPALAN, N.; JANARDHANA, K. K.; Antiperoxidative, anti-inflammatory, and antimutagenic activities of ethanol extract of the mycelium of *Ganoderma lucidum* occurring in South India. **Teratogen Carcinogen Mutagen**. Suppl 1, p. 85-97, 2003.

LEE, B.L.; KIM, W.H.; JUNG, J.; CHO, S. J.; PARK, J. W.; KIM J, CHUNG, H. Y. ; CHANG M.S. ; NAM, S. Y. A hypoxia-independent upregulation of hypoxia-inducible factor-1 by AKT contributes to angiogenesis in human gastric cancer. **Carcinogenesis**. v. 4; 2007.

LEWIN, B. Genes VII. Porto Alegre: **Artmed**, 2001

LIOI, M. B.; SCARFI, M. R.; SANTORO, A.; BARBIERI, R.; ZENI, O.;SALVEMINI, F.; BERARDINO, D.; URSINI, M. V. Cytogenetic damage and induction of pro-

oxidant state in human lymphocytes exposed *in vitro* to glyphosate, vinclozolin, atrazine and dpx-e9636. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 32, p. 39-46, 1998.

LIU, M.; OHUCHI, T.; LEIRI, T.; OHE, M.; MATSUZAKI, S. Shikonin has potent antibacterial activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (Mrsa). **Dokkyo Journal of Medical Sciences**, v.23, p. 63-69, 1996.

LOPES, F. C. M.; CALVO, T. R.; VILEGAS, W.; CARLOS, I. Z. Inhibition of hydrogen peroxide, nitric oxide and TNF- α production in peritoneal macrophages by ethyl acetate fraction from *Alchornea glandulosa*. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v.28, n. 9, p. 1726-1730, 2005.

MACGREGOR JT, WEHR CM, GOULD DH. Clastogen-induced micronuclei in peripheral blood erythrocytes: the basis of an improved micronucleus.test. **Environmental Mutagenesis**. v. 2(4):509-14. 1980.

MACGREGOR, J. T. Mutagenic and carcinogenic effects of flavonoids. **New York: Alan R. Liss**, 1983.

MACHADO, S.C. F.; RODRIGUES, M.P.; NUNES, A.P.M.; DANTAS, F.J.S.; DE MATTOS, J.C.P.; SILVA, C.R.; MOURAB, E.G.; BEZERRA, R.J.A.C.; CALDEIRA-DE-ARAÚJO, A. Genotoxic potentiality of aqueous extract prepared from *Chrysobalanus icaco* L. leaves. **Toxicology Letters**, v.151 p. 481–487, 2004

MACHADO, M. P, FILHO, E. R.; TEREZAN, A.P.; RIBEIRO, L. R.; MANTOVANI, M. S. Cytotoxicity, genotoxicity and antimutagenicity of hexane extracts of *Agaricus blazei* determined in vitro by the comet assay and CHO/HGPRT gene mutation assay.

Toxicology in Vitro v.19 p. 533–539, 2005.

MAJER, B. J.; LAKY, B.; KNASMÜLLER, S.; KASSIE, F. Use of the Micronucleus Assay with exfoliated epithelial cells as a biomarker for monitoring individuals at elevated risk of genetic damage and in chemoprevention trials. **Mutation Research**, v. 489, p. 147-172, 2001.

MAKENA, P. S.; CHUNG, K.-T. Effects of various plant polyphenols on bladder carcinogen benzidine-induced mutagenicity. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, 1899–1909, 2007.

MAKINO-WATANABE,H. Contribuição ao estudo palinológico das Malpighiaceae A. L. Jussieu do Brasil (Tribo Banisterieae, subtribo Banisteriinae). **Tese de Doutorado**, Universidade de Campinas 214p.

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

MARNEWICK, J. L.; GELDERBLOM , W. C.A.; JOUBERT, E. An investigation on the antimutagenic properties of South African herbal teas. **Mutation Research**. v.471 p.157–166. 2000.

MARQUEZ, C.; VILLALOBOS, C.; POBLETE, S.; VILLALOBOS, E.; DE LOS ANGELES GARCIA, M.; DUK, S. Cytogenetic damage in female Chilean agricultural

workers exposed to mixtures of pesticides. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 45,(1), p. 1-7, 2005.

MARTÍNEZ-VÁZQUEZ, M.; GONZÁLEZ-ESQUINCA, A. R.; LUNA, L. C.; GUTIÉRREZ, M. N. M.; GARCÍA-ARGÁEZ, A. N. Antimicrobial activity of *Byrsonima crassifolia* (L.) H.B.K. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 66, p. 79-82, 1999.

MARTÍNEZ, A.; URIOS, A.; BLANCO, M. Mutagenicity of 80 chemicals in *Escherichia coli* tester strains IC203, deficient in oxyR, and its oxyRQ parent WP2 *uvra*/pkm101: Detection of 31 oxidative mutagens. **Mutation Research**, v. 467, p.41-53, 2000.

MARTÍNEZ, A.; URIOS, A.; BLANCO, M. Mutagenicity of 80 chemicals in *Escherichia coli* tester strains IC203, deficient in oxyR, and its oxyRQ parent WP2 *uvra*/pkm101: Detection of 31 oxidative mutagens. **Mutation Research**, v. 467, p.41-53, 2000.

MEIRELES, A. B; MACEDO, M. Plantas medicinais usadas para a saúde bucal pela comunidade do bairro Santa Cruz, Chapada dos Guimarães, MT, Brasil. *Acta botânica brasileira*. v. 20(4), p.771-782, 2006

MENDONÇA, R.; FELFILI, J.; WALTER, B.; SILVA, J.C. JR.; REZENDE, A.; FILGUEIRAS, T.; NOGUEIRA, P.; FLORA VASCULAR DO CERRADO. In: S. SANO & S. ALMEIDA (eds.). Cerrado. Ambiente e flora. pp.. **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa - Cerrados**, Planaltina, Brasil. 288-556,1998.

MICELI, J. J.; WILNER, K. D.; SWAN, S. K.,; TENSFELDT, T.G. Pharmacokinetics, safety, and tolerability of intramuscular ziprasidone in healthy volunteers. **Journal Clinical Pharmacology**. v.45(6), p. 620-30. 2005.

MIYAJI CK, POERSCH A, RIBEIRO LR, EIRA AF, COLUS IM. Shiitake (*Lentinula edodes* (Berkeley) Pegler) extracts as a modulator of micronuclei induced in HEp-2 cells. **Toxicol In Vitro**. v.20(8), p. 1555-9. 2006.

MONGELLI, E.; DESMARCHELIER, C.; RODRIGUEZ, T. J.; COUSSIO, J.; CICCIA, G. In vitro antioxidant and cytotoxic activity of extracts of *Baccharis coridifolia* DC.J **Ethnopharmacology**. v.58(3), p,. 157-63, 1997.

MORTELMANS, K.; ZEIGER, E. The Ames *Salmonella*/Microsome Mutagenicity Assay. **Mutation Research**, v. 455, p. 29-60, 2000.

MOURE, A.; CRUZ, J. M.; FRANCO, D.; DOMINGUES, J. M.; ALENCAR, J. W.; MATOS, F.J.A. Volatile constituents of *Eugenia uniflora* leaf from Northeastern Brazil. **Journal of Essential Oil Research**, v.8, (4), p.449-51.

NAMIKI M. Antioxidants/antimutagens in food. Crit Rev **Food Sciences Nutrition**. v.29(4),p. 273-300, 1990.

NIKAWA, M., HAYASHI, H., SATO, T., NAGASE, H., KITO H. Isolation of substance from glossy privet (*Ligustrum lucidum* Ait). Inhibiting the mutagenicity of benzo (a) pyrene in bacteria. **Mutation Research** v.319, p.1-9, 1993.

NGOUELA, S.; NDLAKOU, B. L.; TCHAMO, D. N.; ZELEFACK, F.; TSAMO, E.;
CONNOLLY, J. D. A prenylated xanthone with antimicrobial activity from the seeds of
Symphonia globulifera. **Natural Products Research**, v. 19, p.241-246, 2005.

NOGUEIRA ME, PASSONI MH, BISO FI, LONGO MDO C, CARDOSO CR,
SANTOS LC, VARANDA EA Investigation of genotoxic and antigenotoxic activities of
Melampodium divaricatum in *Salmonella typhimurium*. **Toxicology In Vitro**. v.20(3),
p. 361-6, 2006.

NOVICK, A.; SZILARD, L. Anti-mutagens. **Nature**. V. 29;170(4335), p.926-7, 1952.

NOZAWA, H.; TAZUMI, K.; SATO, K.; YOSHIDA, A.; TAKATA, J.; ARIMOTO-
KOBAYASHI, S.; KONDO, K. Inhibitory effects of beer on heterocyclic amine-
induced mutagenesis and PhIP-induced aberrant crypt foci in rat colon. **Mutation
Research**. v. 559, n. 1-2, p. 177-187, 2004.

OKUDA, T.; YOSHIDA, T. New methods of analyzing tannis. **Journal of Natural
Products**, v.52, p. 1-13, 1989.

OLIVEIRA, F. A.; COSTA, C. L.; CHAVES, M. H.; ALMEIDA, F. R.;
CAVALCANTE, I. J.; LIMA, A. F.; LIMA, R.C. JR.; SILVA, R. M.; CAMPOS, A. R.;
SANTOS, F. A.; RAO, V.S. Attenuation of capsaicin-induced acute and visceral
nociceptive pain by alpha- and beta-amyrin, a triterpene mixture isolated from *Protium
heptaphyllum* resin in mice. **Life Science**. v.21, n.77(23), p.2942-2952. 2005.

OVESNÁ, Z.; VACHALKOVA, A.; HORVATHOVA, K.; TOTHOA, D. Pentacyclic triterpenoic acids: new chemopreventive compounds. Minireview, **Neoplasma**, v. 51, p. 327-333. 2004.

PARK, K. Y.; JUNG, G. O.; LEE, K. T.; CHOI, J.; CHOI, M. Y.; KIM, G. T.; JUNG, H. J.; PARK, H. J.; Antimutagenic activity of flavonoids from the heartwood of *Rhus verniciflua*. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 90, 73-79, 2004.

PARKER, M.E.; CHABOT, S.; WARD, B.J.; JOHNS, T. Traditional dietary additives of the Maasai are antiviral against the measles virus. **Journal Ethnopharmacology**. v.3, 2007.

PATOCKA, J. Biologically active pentacyclic triterpenes and their current medicine significance. Review; **Journal of Applied Biomedicine**, v.1, p.7-12. 2003.

PETRA, W.; SNIJMAN, A.; SONJA, S.B.; JOUBERT, C.F; IVAN, R.; GREEN, D.; WENTZEL, C.; GELDERBLOM, A. The antimutagenic activity of the major flavonoids of rooibos (*Aspalathus linearis*): Some dose-response effects on mutagen activation-flavonoid interactions. **Mutation Research**, v.631, p. 111-123, 2007

RAMEL C. Pollution, carcinogenesis and cancer prevention. **Acta Oncology**. v.30(6), p.27-33, 1991.

RAMEL, C.; ALEKPEROV, U. K.; AMES, B. N.; KADA, T.; WATTENBERG, L. W. Inhibitors of mutagenesis and their relevance to carcinogenesis. **Mutation Research**, v. 168, p. 47-65, 1986.

RAMOS, A.; RIVERO, R.; VICTORIA, M.C.; VISOZO, A.; PILOTO, J.; GARCIA, A. Assessment of mutagenicity in *Parthenium hysterophorus* L. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 77, p.25–30, 2001.

RAUNIO H, HUSGAFVEL-PURSIAINEN K, ANTTILA S, HIETANEN E, HIRVONEN A, PELKONEN O. Diagnosis of polymorphisms in carcinogen-activating and inactivating enzymes and cancer susceptibility-a review. **Gene**. v. 14;159(1), p.113-21. 1995

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.

RIBEIRO, J.F.; SANO, S.M.; DA SILVA, E J.A. Chave preliminar de identificação dos tipos fisionômicos da vegetação do Cerrado. In: **Anais do XXXII Congresso Nacional de Botânica. Sociedade Botânica do Brasil**, Teresina, Brasil. p. 124-133, 1981.

RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. Mutagênese ambiental, Ulbra, Canoas-RS, 2003. 355p.

RODRIGUES, V.E.; ECARVALHO, D.A. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais no domínio do cerrado na região do Alto Rio Grande - Minas Gerais. **Ciência Agrotóxical Lavras**, v. 25, (1), pp.102-123, 2001.

RODRIGUES, C. M. .; RINALDO, D.; SANNOMIYA, M. DOS SANTOS, L.C.; MONTORO, P.; PIACENTE, S.; PIZZA, C.; VILEGAS, W. High-performance Liquid Chromatographic Separation and Identification of Polyphenolic Compounds from the Infusion of *Davilla elliptica* St. Hill. **Phytochemical Analysis**. 2007 Jul 24; [Epub ahead of print].

ROBBERS, J. E.; SPEEDLE, M. K.; TYLER, V. E.; Pharmacognosy and Pharmacobiotechnology. Baltimore: Williams e Wilkins. 1996, 337p.

ROY M, CHAKRABARTY S, SINHA D, BHATTACHARYA RK, SIDDIQI M. Anticlastogenic, antigenotoxic and apoptotic activity of epigallocatechin gallate: a green tea polyphenol. **Mutation Research**. v. 523-524, p.33-41, 2003.

RYU, H.I.; KIM, C.J. Immunologic reactivity of a lipopolysaccharide-protein complex of type A *Pasteurella multocida* in mice. **Journal Veterinary Science**. v.1(2), p.87-95, 2000.

SALEEM, M., AFAQ, F., ADHAMI, V. M., MUKHTAR, H. Lupeol modulates NF- κ B and PI3K/Akt pathways and inhibits skin cancer in CD-1 mice. **Oncogene**, v.23, p. 5203-5214, 2004.

SALVADORI, D. M.F.; RIBEIRO, L. R.; XIAO, Y.; BOEI, J. J.; NATARAJAN, A.T. Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis Radioprotection of p-carotene evaluated on mouse somatic and germ cells. **Mutation Research** v.356, p.163- 170, 1996.

SANNOMIYA M, RODRIGUES CM, COELHO RG, DOS SANTOS LC, HIRUMA-LIMA CA, SOUZA BRITO AR, VILEGAS W. Application of preparative high-speed counter-current chromatography for the separation of flavonoids from the leaves of *Byrsonima crassa* Niedenzu (IK). **Journal Chromatography A**. v. 30;1035(1), p.47-51, 2004

SANNOMIYA, M.; FONSECA, V. B.; SILVA, M. A. D.; ROCHA, L. R. M.; SANTOS, L. C. D.; HIRUMA-LIMA, C. A.; BRITO, A. R. M. S.; VILEGAS, W. Flavonoids and antiulcerogenic activity from *Byrsonima crassa* leaves extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, p. 1-6, 2005.

SANTOS, F.V. avaliação da mutagenicidade *in vivo* e *in Vitro* de compostos obtidos de plantas Nativas do cerrado. **Tese de doutorado** (UNESP-ARARAQUARA) 2006.

SCALBERT, A. Antimicrobial properties of tannins. **Phytochemistry**, v.30, p. 3875-3883. 1991.

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

SHIMIZU, K.; ASHIDA, H.; MATSUURA, Y.; KANAZAWA, K. Antioxidative bioavailability of artemisinin C in Brazilian propolis. **Archives of Biochemistry and Biophysics** v.424, p.181–188, 2004.

SHISHODIA, S.; MAJUMDAR, S.; BANERJEE, S.; AGGARWAL, B. B. Ursolic acid inhibits nuclear factor- κ B activation induced by carcinogenic agents through

suppression of IkappaBalpha kinase and p65 phosphorylation: correlation with down-regulation of cyclooxygenase 2, matrix metalloproteinase 9, and cyclin D1. **Cancer Research**, v.63, p.4375-4383, 2003.

SHISHU, S. A. K.; KAUR, I. P. Inhibitory effect of curcumin and its natural analogues on genotoxicity of heterocyclic amines from cooked food. **Indian Journal Experiment Biology**. v. 40, n. 12, p. 1365-1372, 2002.

SHISHU, S. A. K.; KAUR, I. P. Inhibition of mutagenicity of food-derived heterocyclic amines by sulphoraphene—an isothiocyanate isolated from radish. **Planta Medica**. v. 69, n. 2, p. 184-186, 2003.

SHU, Y. –Z. Recent natural products based drug development: a pharmaceutical industry perspective. **Journal Natural Products**. v.6, p.1053-1071, 1998.

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

SLESINSKI, R. S.; GUZZIE, P. J. Review of recent advances in the development and application of the micronucleus test. In: BALLANTYNE, B. Perspectives in basic and applied toxicology. **London: John Wrigth**, 1988.

SMIT, H. F.; WOERDENBAG, H. J.; SINGH, R. H.; MEULENBELD, G. J.; LABADIE, R. P.; ZWAVING, J. H. Ayurvedic herbal drugs with possible cytostatic activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 47, p. 75-84, 1995.

SNIJMAN, P.W.; SWANEVELDER, S.; JOUBERT, E.; GREEN, I.R.; GELDERBLUM, W.C. The antimutagenic activity of the major flavonoids of rooibos (*Aspalathus linearis*): some dose-response effects on mutagen activation-flavonoid interactions. **Mutation Research**. v.28, n.631(2), p.111-123. 2007.

SOMOVA, L. O.; NADAR, A.; RAMMANAN, P.; SHODE, F.O. Cardiovascular, antihyperlipidemic and antioxidant effects of oleanolic and ursolic acids in experimental hypertension. **Phytomedicine**. v. 10(2-3), p.115-21, 2003.

SOOBRAATTEE, M.A.; NEERGHEEN, V.S.; LUXIMON-RAMMAA, A.; ARUOMAB, O.I.; BAHORUN, T. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions. **Mutation Research**, v. 579, 200–213, 2005.

TANGVARASITTICHA, S.; SRIPRANG, N.; HARNROONGRO, J.; T.; CHANGBUMRUNG, S. Antimutagenic activity of *Sesbania javanica* Miq. flower DMSO extract and its major flavonoid glycoside. **Southeast Asian Journal Tropical Medicine Public Health**. V.36(6), p.1543-51, 2005.

STAGOS, D.; KAZANTZOGLOU, G.; THEOFANIDOU, D.; KAKALOPOULOU, G.; MAGIATISM, P.; MITAKU, S.; KOURETAS, D. Activity of grape extracts from Greek varieties of *Vitis vinifera* against mutagenicity induced by bleomycin and hydrogen peroxide in *Salmonella typhimurium* strain TA102, **Mutation Research**, v. 609, 165–175, 2006.

SUBBARAMAIAH, K.; MICHALUART, P.; SPORN, M. B.; DANNENBERG, A. J. Ursolic acid inhibits cyclooxygenase-2 transcription in human mammary epithelial cells. **Cancer Research**, v. 60, p. 2399-2404, 2004.

SURRALLÉS, J.; NATARAJAN, A. T. Human lymphocytes Micronucleus Assay in Europe. An international survey. **Mutation Research**, v. 392, p. 165-174, 1997.

TAYLOR, J. L. S.; ELGORASHI, E. E.; MAES, A.; GORP, U. V.; KIMPE, N. D.; STADEN, J. V.; VERSCHAEVE, L. Investigating the safety of plants used in South African traditional medicine: Testing for genotoxicity in the micronucleus and alkaline comet assays. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 42, p. 144- 154, 2003.

TACHINO,N., GUO, D., DASWOOD, W. M., YAMANE, S., LARSEN, R., DASHWOOD, R., 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. **Mutation Research**, v. 308,191-203. 1994.

TANEJA P, ARORA A, SHUKLA Y. Antimutagenic effects of black tea in the Salmonella typhimurium reverse mutation assay. **Asian Pacific Journal Cancer Prevention**. v.4(3), p. 193-8, 2003.

TIBERTI, L.A.; YARIWAKE, J.H.; NDJOKO, K.E.; HOSTETTMANN, K. Short communication Identification of flavonols in leaves of *Maytenus ilicifolia* and *M. aquifolium* (Celastraceae) by LC/UV/MS analysis. **Journal of Chromatography B**,v. 846, p. 378–384, 2007.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. Microbiologia,.. **Editora Atheneu**. 4ªed., 2004, 718p.

TRUEBA, G.P.; SANCHEZ, G.M. Los flavonóides como antioxidantes naturales. **Acta Farmacology**. Bonaerense, v. 20, p. 297-306, 2001

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

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

VARELLA, S. D.; GONSALVES, E. R.; BIELLA, C. A.; VARANDA, E. A.; SACRAENTO, L. V. S. Odo. Avaliação do extrato de *Momordica charantia* em *Salmonella thyphimurium*: mutagenicidade e antimutagenicidade. **Revista de Ciências Farmarmaceuticas.**, São Paulo, v. 22(1), p. 41-56, 2001.

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

VARGAS VM, MOTTA VE, HENRIQUES JA. Mutagenic activity detected by the Ames test in river water under the influence of petrochemical industries. **Mutation Research**. v. 319(1), p. 31-45, 1993.

VERDI, G. L. ; BRIGHENTE, C. M. I.; PIZZOLATTI, G. M. Gênero *Baccharis* (Asteracea): Aspecto químico, econômico e biológico. **Química Nova**, v. 28, p. 85-94, 2005.

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

WATERS AP, MCCUTHAN TF. Ribosomal RNA: nature's own polymerase-amplified target for diagnosis, **Parasitology Today**. v. 6(2), p. 56-9, 1990.

WEISBURGER, J. H. Eat to live, not live to eat. **Nutrition**, v. 16, p. 767-773, 2000.

WINK, M. Physiology of secondary product formation in plants. In: CHARLWOOD, B. V.; RHODES, M. J. C. (ed.). Secondary product from plant tissue culture. **Oxford: Clarendon**, 1990.

YAMAGUCHI, L. F.; VASSÃO, D.G.; KATO, M.J.; MASCIO, P. DI; Biflavonoids from Brazilian pine *Araucaria angustifolia* as potentials protective agents against DNA damage and lipoperoxidation. **Phytochemistry**, v.66, p. 2238–2247, 2005.

YOSHINO, M.; HANEDA, M.; NARUSE, M.; MURAKAMI, K. Prooxidant activity of flavonoids: Copper-dependent strand breaks and the formation of 8-hydroxy-2-deoxyguanosine in DNA. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 68,p. 468-472, 1999.

YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. Plantas Medicinais: sob a ótica da química medicinal moderna. **Argos**, Chapecó. 2001, 500p

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

REFERÊNCIAS ELETRÔNICAS

PEREIRA, I. M. Taxonomia E Ecologia Da Família Dilleniaceae Salisb., Nos Estados De Goiás E Tocantins. **<http://www.ecoevol.ufg.br/pg/projet2005.htm>** acessado em 23/08/2007.

A. A.JÚNIOR **Categoria:** Conhecimentos Gerais **Assunto:** GEOGRAFIA.
<http://www.juliobattisti.com.br/tutoriais/arlindojunior/geografia004.asp> acessado em 20/06/07.

Mapa de Biomas e de Vegetação
http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=169&id_pagina=1 acessado em: 3/07/07.

Capítulo II

1. Artigo publicado

Journal of MEDICINAL FOOD

Journal of Medicinal Food: <http://mc.manuscriptcentral.com/medicinalfood>

Modulatory effect of *Byrsonima basiloba* extracts on the mutagenicity of certain direct and indirect-acting mutagens in *Salmonella typhimurium* assays

Journal:	<i>Journal of Medicinal Food</i>
Manuscript ID:	JMF-2007-0553.R1
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Moraes, Walclecio; FCF-UNESP, Biological Sciences Santos, Fábio; FCF-UNESP, Biological Sciences Sannomiya, Miriam; IQ-UNESP, Organic Chemistry Rodrigues, Clenilson; IQ-UNESP, Organic Chemistry Vilegas, Wagner; IQ-UNESP, Organic Chemistry Varanda, Eliana; FCF-UNESP, Biological Sciences
Keyword:	cancer, chemoprevention, flavonoids, genotoxicity, tea



Modulatory effect of *Byrsonima basiloba* extracts on the mutagenicity of certain direct and indirect-acting mutagens in *Salmonella typhimurium* assays

Walclecio Lira de Moraes¹, Fabio Vieira dos Santos¹, Miriam Sannomiya²,Clenilson Martins Rodrigues², Wagner Vilegas², Eliana Aparecida Varanda^{1*}

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

²Chemical Institute of Araraquara, UNESP- São Paulo State University, Rua Prof.Francisco Degni s/n, 14801-970, Araraquara, SP, Brazil

Running title: Antimutagenic effect of *Byrsonima basiloba*

*Corresponding author. Tel.: +55-16-33016951; Fax: +55-16-3322-0073

E-mail address: varandae@fcfar.unesp.br

Abbreviations: HF: Hexane fraction; DF:Dichloromethane fraction; MF: Methanol fraction; EtOAc: Ethyl acetate; CC: Column chromatography; CHCl₃: Chloroform; MeOH: Methanol ; MeOH:H₂O: Methanol:water ratio; NMR: Nuclear Magnetic Resonance; NP/PEG: Diphenylaminoborate (Natural products – Polyethylene glycol 4000); TMS: Tetramethylsilane

ABSTRACT

Byrsonima basiloba A. Juss. species is a native arboreal type from the Brazilian “cerrado” (tropical American savanna) and the local population uses it to treat diseases, such as diarrhea and gastric ulcer. It belongs to the Malpighiaceae family and it is commonly known as “murici”. Considering the popular use of *B. basiloba* derivatives and the lack of pharmacological potential studies regarding this vegetal species, the mutagenic and antimutagenic effect of MeOH (methanol) and CHCl₃ (chloroform) extracts were evaluated by the Ames test, using the strains TA97a, TA98, TA100 and TA102 of *Salmonella typhimurium*. No mutagenic activity was observed in any of the extracts. To evaluate the antimutagenic potential, direct and indirect mutagenic agents were used: 4 nitro-o-phenylenediamine (NPD), sodium azide (SAZ), mitomycin C (MMC), aflatoxin B₁ (AFL), benzo(a)pyrene (B(a)P) and hydrogen peroxide (H₂O₂). Both the extracts evaluated showed antimutagenic activity, but the highest value of inhibition level (89%) was obtained with MeOH extract, strain TA100 in presence of AFL. Phytochemical analysis of the extracts revealed the presence of *n*-alkanes, lupeol, ursolic and oleanolic acid, (+)-catechin, quercetin-3-*O*- α -L-arabinopyranoside, gallic acid, methyl gallate, amentoflavone, quercetin, quercetin-3-*O*-(2’’-*O*-galloyl)- β -D-galactopyranoside and quercetin-3-*O*-(2’’-*O*-galloyl)- α -L-arabinopyranoside.

Keywords: Ames test, Antimutagenic, *Byrsonima*, Mutagenic.

INTRODUCTION

Compounds capable of promoting mutation are found in our daily diet, as well as in air and water pollution, drinks, medications and solar radiation. It is known that mutations are the main factor for the onset of cancer. Chemoprevention, i.e. prevention against cancer development by chemical substances that act as antimutagenic agents and present the capacity to interact with mutagenic compounds or their metabolites and reduce their effects, is one possible alternative for fighting cancer.¹

Exposure to environmental mutagenic substances can influence not only the development of cancer, but also cardiovascular and neurodegenerative diseases.^{2,3,4}

The *Byrsonima basiloba* A. Juss. species belongs to the Malpighiaceae family, is commonly known as “murici”,⁵ and the local population uses its derivative products for the treatment of diseases, such as diarrhea and gastric ulcer. However, no effective biological activity has been detected up to now, since only a few studies have been realized regarding this species. Previously, our group reported the antidiarrhoeal activity of methanolic and hydromethanolic extracts obtained from the leaves of *B. cinera* (now formally documented as *B. basiloba*) determined by intestinal motility in Swiss mice. This assay showed a significant reduction in gastrointestinal motility of both extracts evaluated. A chemical study of the methanolic extract of this species revealed (+)-catechin and quercetin-3-*O*- α -L-arabinopyranoside.⁶

Other species of the *Byrsonima* genus are characterized by the presence of sulfonoglycolipids, phytosterols, triterpenes, aromatic esters, amino acids, proanthocyanidin and flavonoids.⁷

Considering the popular use of *B. basiloba*, as well as the limited number of pharmacological potential studies regarding this vegetal species, the mutagenic and antimutagenic effect of methanol and chloroform extracts were evaluated using different mutagens with direct (sodium azide, mitomycin C, hydrogen peroxide, 4 nitro-o-phenylenediamine) and indirect action (aflatoxin B₁, benzo(a)pyrene, hydrogen peroxide). This study was based on the *Salmonella* reversion assay, which is widely used for the detection of antimutagenic agents, especially those present in plant extracts.^{8,9,10,11}

MATERIAL AND METHODS

Chemicals

Dimethylsulfoxide (DMSO), methanol, chloroform, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate sodium salt, D-glucose-6-phosphate disodium salt, magnesium chloride, L-histidine monohydrate, D-biotin, sodium azide (SAZ), 2-anthramine, 4-nitro-o-phenylenediamine (NPD), mitomycin C (MMC) benzo(a)pyrene (B(a)P), and aflatoxin B₁ (AFL) were purchased from Sigma Chemical Co (St. Louis, USA). Oxoid Nutrient Broth No. 2 (Oxoid, England) and Difco Bacto Agar (Difco, USA) were used as bacterial media. D-glucose, magnesium sulfate, citric acid monohydrate, anhydrous dibasic potassium phosphate, sodium ammonium hydrogen phosphate, monobasic sodium phosphate, dibasic sodium phosphate, sodium chloride and hydrogen peroxide (H₂O₂) were purchased from Merck (Whitehouse Station, NJ).

Vegetal material

Leaves of *Byrsonima basiloba* A. Juss. were collected at Pratânia, São Paulo, Brazil by Luiz Fernando R. de Almeida of the Botucatu Institute of Biosciences of São Paulo State University, SP, Brazil (IBB-UNESP, Botucatu, SP, Brazil) and identified by Dr. Jose

Clemente Campos, also of the IBB-UNESP. Exsiccates of number 24163 can be found in the UNESP Herbarium, Botucatu.

Ames mutagenicity assay

The *Salmonella* mutagenicity assay was performed using the preincubation method,¹² for 20–30 min with *S. typhimurium* strains TA100, TA98, TA97a and TA102, with and without metabolic activation. The metabolic activation mixture (S9 mix) was freshly prepared before each test using an Aroclor-1254-induced rat-liver fraction purchased (lyophilized) from Moltax Molecular Toxicology Inc. The *S. typhimurium* strains were kindly provided by Dr. B. Ames of the University of California, Berkeley, CA, USA.

Five different doses of the compounds extracted from the leaves of *B. basiloba* were evaluated in this assay; all of them diluted in dimethylsulfoxide. The chloroform extract was tested in the mutagenicity assay at doses of 1.99, 3.97, 7.95, 11.92 and 15.90 mg/plate and the methanol extract at doses of 3.65, 7.30, 14.60, 21.90 and 29.20 mg/plate. For the antimutagenicity assay the following concentrations were used: 0.99, 1.99, 3.97, 7.95 and 15.90 mg/plate for the chloroform extract and 0.46, 0.91, 1.82, 3.65, 7.30, 14.60 and 21.90 mg/plate for the methanol extract.

The concentrations used were based on the bacterial toxicity of each preparation, estimated in a preliminary test. In all subsequent assays, the upper limit of the dose range tested was either the highest nontoxic dose or the lowest toxic dose determined in this preliminary assay. Toxicity was apparent either as a reduction in the number of his⁺ revertants or as an alteration in the auxotrophic background (i.e. background lawn).

Each concentration of the tested mixtures was added to 500 µL of buffer pH 7.4 or 500 µL of S9 mix (for test the influence of metabolic activation) and 100 µL of bacterial culture and then incubated at 37 °C for 20–30 min. After this time 2 mL of top agar was

added and the mixture was poured on to a plate containing minimal agar. The plates were incubated at 37°C for 48h and the his⁺ revertant colonies were manually counted. All the experiments were performed in triplicate.

The standard mutagens used as positive controls in experiments without S9 mix were 4-nitro-o-phenylenediamine (10 µg/plate) for TA98 and TA97a, sodium azide (1.25 µg/plate) for TA100 and daunomycin (3 µg/plate) for TA102. 2-Anthramine (0.125 µg/plate) was used in the experiments with metabolic activation for all strains. DMSO served as the negative (solvent) control (100 µL/plate).

Statistical analysis was performed with the Salanal computer program, adopting the Bernstein *et al.*¹³ model. The mutagenic index (MI) was also calculated for each dose, as the average number of revertants per plate divided by the average number of revertants per plate of the negative (solvent) control. A sample was considered positive when MI ≥ 2 for at least one of the tested doses and when the response was dose dependent.¹⁴

Ames antimutagenicity assay

According to the methodology of preincubation in plates, developed by Maron and Ames,¹² different concentrations of MeOH and CHCl₃ extracts of *B. basiloba* were mixed with 0.1mL of bacterial culture and the mutagenic agent (sodium azide, 4 nitro-o-phenylenediamine, mitomycin C, hydrogen peroxide, aflatoxin B₁ or benzo(a)pyrene) and then incubated at 37°C for 20-30 minutes. After incubation, 2mL of top agar were added and supplemented with traces of histidine and biotin and the content of each tube was lightly homogenized and poured on a plate with minimum glucose agar. After the solidification of 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. The percentage of mutagenicity inhibition was calculated according to Tachino *et al.*,¹⁵ where:

Inhibition= 1-
$$\frac{\text{Revertants induced/plate (with inhibitor)}}{\text{Revertants induced/plate (without inhibitor)}} \times 100$$

A non-antimutagenic effect was considered when a value lower than 25% was obtained, a moderate effect when a value between 25% and 40% was obtained and strong antimutagenicity at values greater than 40%.¹⁶

Cell viability was also determined for each antimutagenesis experiment to evaluate the potential bactericidal effect of the mutagens. The responses were considered cytotoxic when the percentage of sample survival was less than 60% of the total observed for the negative control.¹⁷

Phytochemical analysis

The powdered leaves (800 g) were extracted exhaustively and successively with chloroform and methanol at room temperature; 48 h for each solvent. The solvents were evaporated at 60°C under reduced pressure providing the CHCl₃ (94.5 g) and MeOH (79.3 g) extracts, respectively. The yields (w/w) for the CHCl₃ and MeOH extracts from the dried powders of *B. basiloba* leaves were 11.8 % and 9.9 %, respectively.

A portion of CHCl₃ extract (30.0 g) was filtrated in a silica column (15 cm x 5.0 i.d.) to separate the compounds according to their polarity. This column initiated the elution with a pure *n*-hexane solvent, then with dichloromethane and finally methanol. After evaporation of the remaining solvent, the hexane (HF, 0.4 g), dichloromethane (DF, 12.0 g) and methanolic (MF, 10.3 g) fractions were obtained, respectively. Part of the HF was chromatographed in a chromatography column (Silica gel 60) with hexane (100%) that produced an *n*-alkane mixture of C-30 to C-34 consisting almost exclusively of triacontane (C-30) and dotriacontane (C-32). The MF was analogously fractionated by silica gel column

chromatography using chloroform as an eluent, gradually increasing the polarity with MeOH. The fractions were guided to provide ursolic and oleanolic acids. The DF resulted in an exclusive mixture of lupeol. These triterpenes were identified by comparison of their spectroscopic data with those reported in the literature.¹⁸

n-alkane identification; gas chromatography analyses

Gas chromatography (GC) analyses were performed using a Varian 3380 gas chromatograph equipped with a fused silica CBP-5 capillary column (25 m x 0.33 mm i.d.; film thickness 0.5 m) coupled to the a flame ionization detector (FID). Hydrogen was used as the carrier gas (60 Kpa), and the injection split ratio was 1:30. The injection temperature was 250°C; the column temperature was maintained at 50°C for 1 min, and then increased to 300°C at 10°C/min, where this temperature was maintained for 10 min; the detector temperature was 280°C. *n*-alkane standards and the fraction isolated from the HF of 1 µL were manually injected using a 10 µL Hamilton syringe.

Phytochemical screening and compound isolation from the MeOH extract

The fresh methanol extract proved positive for steroids, flavonoids and proanthocyanidins.¹⁹

A portion (10.0 g) of the MeOH extract of *B. basiloba* was partitioned with a mixture of EtOAc/H₂O (1:1, v/v). The EtOAc fraction (4.0 g) was submitted to Gel Permeation Chromatography (GPC) on a Sephadex LH-20 (Pharmacia) column (57 x 3 cm), eluted with MeOH. Fractions (15 ml) were collected and checked by (Thin Layer Chromatography) TLC on Si gel plates eluted with a mixture of CHCl₃/MeOH/H₂O (80:18:2, v/v) and revealed either with NP/PEG reagent or with anisaldehyde/sulfuric acid solution.²⁰ Fractions 28-32 (60.0 mg) were successively fractionated by CC on silica gel (Merck, 10.0 cm x 1.5 i.d.) eluted with

CHCl₃/MeOH (90:10, v/v) providing gallic acid and methyl gallate (18.0 mg). Fractionation was realized by cellulose column (12.0 x 1.5 i.d.) using MeOH/H₂O (80:20) to yield the pure biflavonoid amentoflavone (8.0 mg).

The NMR spectra in DMSO-d₆ were obtained using a Varian INOVA 500 spectrometer, operating at 500 MHz for ¹H and 150 MHz for ¹³C. Chemical shifts are given as δ (ppm) using TMS as an internal standard. TLC analyses were performed on silica gel Si F254 (Merck) plates eluted with CHCl₃/MeOH (80:20, v/v). The plates were visualized using UV light (254 nm).

HPLC analysis

The HPLC quantitative analysis of the methanol extract was performed with a liquid chromatograph equipped with a ProStar 210 dual solvent pump, a ProStar 330 photodiode array detector (Varian, Walnut Creek, CA, USA) and a Rheodyne 7125 sample injector with a 20 μ L sample loop (Rheodyne, Cotati, CA, USA). The analytical column was a Phenomenex Luna C2 RP18 (250 x 4.6 mm I.D. x 5 μ m, equipped with a Phenomenex security guard 4.0 x 2.0 mm, Torrance, CA, USA). The mobile phase compositions used were: water (eluent A) and acetonitrile (eluent B), both containing 0.05% TFA (trifluoroacetic acid). The gradient program was as follows: 27-34% B (3 min), 34-65% B (42 min) and 65-100% (5 min). Total run time was 50 min. The flow rate of the mobile phase was 1.0 mL min⁻¹. Star LC Workstation software was used for both the operation of the detector and for data processing. These experiments permitted the identification of the flavonoids: quercetin-3-*O*-(2''-*O*-galloyl)- β -D-galactopyranoside, quercetin-3-*O*-(2''-*O*-galloyl)- α -L-arabinopyranoside and quercetin. Compound identification was performed by comparison retention time, by spiking with known standards and by comparison with previously isolated compounds under the same conditions. Methods using external standards were used to quantify each compound. For

calibration curves, appropriate volumes of the standard stock solutions in rutin (1.0 mg mL^{-1}) were diluted with 75% methanol. For quantitation, peak areas were compared with the calibration curves. Flavonol glycosides and aglycones were calculated as rutin in the concentration range of $10\text{-}500 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ ($y = -4.81 \cdot 10^5 + 1.91 \cdot 10^5 x$, $R^2 = 0.9999$, $n = 7$, $\lambda = 360 \text{ nm}$). The HPLC quantitative data were expressed as milligrams of flavonoid derivative per gram of solid extract (Table 6).

RESULTS

Mutagenic activity

After the mutagenicity evaluation of the methanol and chloroform extracts of the *B. basiloba* species, no positive mutagenicity was verified (Table 1). The results obtained for the chloroform extract presented an increase in the frequency of revertants in the strain TA100 (-S9), but the ratio of mutagenicity was not higher than 2. In the same strain, the methanol extract became cytotoxic after metabolic activation of the highest three doses tested. In strain TA97a, cytotoxicity was also evident without metabolic activation.

Antimutagenic activity

The results obtained regarding verification of the antimutagenic potential of *B. basiloba* extracts are presented in Tables 2- 5.

The MeOH extract was evaluated in strains TA97a, TA98, TA100 and TA102, using direct, NPD, SAZ, MMC and H_2O_2 and indirect mutagens, AFL, B(a)P and H_2O_2 . When the strain TA97a was used, this extract presented no reduction in the number of revertant colonies. However, in strain TA98, levels of reduction were obtained when tested with NPD (32-81% -Table 2), AFL (68-81%) and B(a)P (66-82%) (Table 3). For strain TA100, the MeOH extract showed no protective effects against the action of SAZ (Table 2) but showed a

strong protective effect when associated with AFL (84-89% - Table3). The protective action of the extract against H₂O₂ mutagenic effect was evaluated in strain TA102, and it was concluded that the mutagenic potential was significantly reduced independent of the presence or absence of metabolization. The levels observed vary from 34–52% (Table 2) when tested in the absence of metabolic activation and around 60% when tested in the presence of metabolization (Table 3). Besides H₂O₂, a significantly reduction on the number of revertant colonies also occurred in the same strain when the mutagen used was MMC (13-65% - Table 2).

As for the CHCl₃ extract, a general reduction in the mutagenic potential of the inductor agents was observed. The levels of reduction were from 75-78% for NPD (Table 4), and 10-78% for B(a)P in the strain TA97a (Table 5). For strain TA98, the levels varied from 32-61% for NDP (Table 4), 56-66% for B(a)P and 66-74% for AFL (Table 5). In the case of TA100, the levels of reduction obtained with SAZ were 25-79% (Table 4) whereas for B(a)P and AFL, toxicity was observed at all concentrations (Table 5). For the strain TA102, when H₂O₂ was used without metabolization, the levels obtained varied from 2-46% (Table 4) and in the presence of metabolization, the levels were around 60% (Table 5). When the inductor agent was MMC, the levels of reduction were 0.4-67% (Table 4).

Phytochemical analysis

The HF of the CHCl₃ extract from *B. basiloba* was then analyzed by GC under the same condition as the aforementioned hydrocarbon standard, in order to obtain chromatograms and retention times. The results of hydrocarbon analyses showed the presence of a mixture of *n*-alkanes (C₃₀-C₃₄). These consisted of only saturated straight chain hydrocarbons with triacontane (C-30) and dotriacontane (C-32) as the major components.

Fractionation of the DF resulted in the isolation of lupeol and the MF provided ursolic and oleanolic acid.

The initial study of the MeOH extract of *B. basiloba* showed the presence of (+)-catechin and quercetin-3-*O*- α -L-arabinopyranoside.⁶ In this work, the isolation or identification of gallic acid, methyl gallate, the biflavonoid amentoflavone, quercetin-3-*O*-(2''-*O*-galloyl)- β -D-galactopyranoside, quercetin-3-*O*-(2''-*O*-galloyl)- α -L-arabinopyranoside and quercetin is described (Table 6).

DISCUSSION

Scientific studies that involve medicinal plants are being developed each day. They are important not only on an academic level, but are also economically and socially important. People have been using alternative medicinal treatments and plants for centuries and the pharmaceutical and cosmetics industries are looking for natural sources of raw materials and active principles for their products.

Nevertheless, in many cases, people do not realize that treatments based on medicinal plants can cause serious risks to their health. Diagnoses are often inaccurate and the symptoms of numerous serious diseases could be hidden by these types of treatment.²¹

Many plants present chemical compounds in their constitution, which can be cyto- or genotoxic and could be related to the development of tumors.²² Reid *et al.*²³ evaluated the mutagenic effect of dichloromethane and 90% methanol extracts of 42 South African plants and observed that methanol extracts from whole plants of *Helichrysum simillimum*, *H. herbaceum* and *H. rugulosum* demonstrated mutagenicity. Thus, the realization of assays for mutagenicity evaluation, as well as of other risks, is essential, given the consumption of natural products by the population.²⁴

In this study, the mutagenicity and antimutagenicity of two different vegetal extracts obtained from the leaves of *B. basiloba* were evaluated, since it is commonly used as a

medicinal plant in Brazil. Using the Ames test, five different concentrations of a polar extract (methanol) and an apolar extract (chloroform) were evaluated.

As shown in Table 1, the chloroform and methanol extracts presented no mutagenicity in any of the strains used. The absence of a mutagenic response by plant extracts against *S. typhimurium* bacterial strains in the Ames assay is a positive step forward in determining the safe use of plants used in traditional medicine. Considering the popular use of this plant, this result is relevant, and assays were then realized to evaluate the antimutagenic activity against direct and indirect mutagens. B(a)P and AFL (indirect), SAZ, NPD, MMC (direct) and H₂O₂ (direct and indirect) were included among these mutagens.

The extracts showed positive results when tested against the mutagenic agents; i.e, they presented antimutagenic potential for more than one strain and were efficient against different mutational mechanisms (frameshift: TA98 and TA97a; base pairs substitution: TA100 and TA102 and antioxidative action: TA102). The highest value of inhibition level (89%) was obtained with MeOH extract, using the strain TA100 in presence of AFL

The phytochemical analysis of the CHCl₃ extrac in this work showed the presence of a mixture of *n*-alkanes (C₃₀-C₃₄), of which triacontane (C-30) and dotriacontane (C-32) were the major components, in addition to these, lupeol, ursolic acid and oleanolic acid were isolated.

The mutagenic or antimutagenic effect of n-alkanes have not been described in the literature, but lupeol, ursolic acid and oleanolic acid are known for their antimutagenic activity.^{25,26,27,28}

Ursolic acid isolated from the ethanolic fraction of *Eriobotrya japonica* markedly and significantly decrease the numbers of *S.typhimurium* TA100 revertants per plate, thus showing antimutagenic activity.²⁹

In addition the presence of lupeol, a triterpene that has had its pharmacological properties approved. According to the literature, lupeol presents antiinflammatory, anti-arthritis, antimutagenic, antioxidative, anticarcinogenic properties,³⁰ as well as hepatoprotective properties against degenerative lesions caused by aflatoxin B₁.³¹

Phytochemical studies of the methanol extract demonstrated the presence of (+)-catechin, quercetin-3-*O*- α -L-arabinopyranoside, quercetin, gallic acid, methyl gallate and the amentoflavone. In previous studies by our group, using another species of *Byrsonima*, no mutagenic activity was observed for (+)-catechin, quercetin-3-*O*- α -L-arabinopyranoside and methyl gallate, however, mutagenic activity was positive for amentoflavone.³² Despite the fact that this biflavonoid presented mutagenic activity, the amount of this compound found in the methanol extract of *B. basiloba* (1.79 mg/g of methanolic extract - Table 6) it is much smaller than that found in *B. crassa* (17.04 mg/g of methanolic extract) and *B.intermedia* extracts (13.70 mg/g of methanolic extract).³³

Another aspect that should be considered is that quercetin also presents mutagenic activity,³⁴ however, in agreement with the present results the amount found in the methanol extract is small (0.53 mg/g of methanol extract) in relation to its glucoside derivatives (Table 6). The literature states that the glucoside quercetin presents significantly diminished pro-oxidant activity when compared to the pro-oxidant effect of quercetin aglycone.³⁵

Methyl gallate presents no mutagenic potential.³⁶ In addition, according to Dauer *et al.*³⁷ catechin caused minimal damage to the genetic material of hepatocytes only at high concentrations. Martínez *et al.*³⁶ also reported this data and showed that catechin was not capable of causing oxidative damage in specific strains of *E. coli*. The same authors state that gallic acid, also found in this vegetal extract, presented the capacity to cause oxidative damage, but that after metabolic activation, this property was no longer present.

Proanthocyanidins, condensed tannins, were isolated from the methanol extract of *B. basiloba* and, according to Yamakoshi *et al.*,³⁸ an enriched fraction of these compounds obtained from grape seeds showed no mutagenic effects in the Ames test, nor on chromosome aberration *in vitro* or in the micronucleus of mice cells. Dauer *et al.*³⁷ reported that a fraction of proanthocyanidins obtained from *Hamamelis virginiana* caused breaks in hepatocyte DNA, which were detected using the comet assay; although, as stated in the same study, this tannin fraction also presented antigenotoxic activity *in vitro*.

Vegetal extracts are used as medicine for several types of illness and may be used as chemopreventives in different parts of the world. Recently, Bunkova *et al.*,³⁹ demonstrated that green tea contains certain antioxidant substances, such as epigallocatechin, epicatechin and catechin, among others, which are capable of reducing the level of mutagenicity to 70%. Using green tea extract, which is rich in polyphenols (catechin, epicatechin), Geetha *et al.*⁴⁰ showed antioxidative activity when it was tested against the oxidant potential of hydrogen peroxide in *Salmonella typhimurium* TA102, in agreement with the results of this study.

Flavonoids present antimutagenic activity in addition to therapeutic properties. Sannomiya *et al.*⁷ showed that the flavonoids in *B. crassa* extract presented a significant antiulcerogenic effect. Park *et al.*⁴¹ analyzed flavonoids in *Rhus verniciflusa* extract and discovered efficiency in the antimutagenic test, with a considerable reduction in the level of mutagenicity promoted by aflatoxin. In general, this study showed that extracts of *Byrsonima* presented positive results for antimutagenicity and that this occurs in the presence of flavonoids.

In the present study, both MeOH and CHCl₃ *B. basiloba* extracts were efficient at protecting genetic material against different types of damage caused by several mutagenic agents. A number of these agents, like aflatoxin B₁, benzo(a)pyrene and hydrogen peroxide, are often found in human daily diet and the environment.

All of these findings highlight that this plant extract could be useful for chemoprevention against damage produced by a variety of mutagenic compounds.

The occurrence rate of cancer is increasing worldwide and the determination of chemopreventive or chemoprophylaxis compounds is important regarding efforts to reduce the risk of cancer.⁴² Antimutagenicity determination of plant extracts is also important in the discovery of new effective anticarcinogenic treatments. A plant extract indicating antimutagenicity is not necessarily an anticarcinogen, however, it is a strong indication of possible anticarcinogenic properties that should stimulate further investigation.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) for providing funds from the Biota-Fapesp Program and to the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico Tecnológico (CNPq) for grants conceded to W.V., E.A.V. and W.L.M.

REFERENCES

1. Roy M, Chakrabarty S, Sinha D, Bhattacharya RK, Siddiqi M: Anticlastogenic, antigenotoxic and apoptotic activity of epigallocatechin gallate: a green tea polyphenol. *Mutation Research* 2003; 523-524:33-41.
2. Aruoma OI: Nutrition and health aspects of free radicals and antioxidants. *Food and Chemical Toxicology* 1994; 32(7): 671-83.

3. De Flora S, D'Agostini F, Masiello L, Giunciuglio D, Albini A: Synergism between N-acetylcysteine and doxorubicin in the prevention of tumorigenicity and metastasis in murine models. *International Journal of Cancer* 1996; 17: 67(6):842-8.
4. Andreassi MG, Botto N, Colombo M.G, Biagini A, Clerico A: Genetic instability and atherosclerosis: can somatic mutations account for the development of cardiovascular diseases? *Environmental and Molecular Mutagenesis* 2000; 35 (4):265-9.
5. Lorenzi H: *Árvores Brasileiras: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil*. Nova Odessa: Instituto Plantarum 2002, pp 351.
6. Figueiredo MF, Michelin DC, Sannomiya M, Silva AP, dos Santos LC, de Almeida LFR, Souza-Brito ARM, Salgado HRN, Vilegas W: Avaliação química e da atividade anti-diarréica das folhas de *Byrsonima cinera* DC. (Malpighiaceae). *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* 2005; 41:1-5.
7. Sannomiya M, Fonseca VB, Silva MAD, Rocha LRM, Santos LCD, Hiruma-Lima CA, Brito ARMS, Vilegas W: Flavonoids and antiulcerogenic activity from *Byrsonima crassa* leaves extracts. *Journal of Ethnopharmacology* 2005; 97: 1-6.
8. Grey CE, Adlercreutz P: Ability of antioxidants to prevent oxidative mutations in *Salmonella typhimurium* TA102. *Mutation Research* 2003; 527:27–36.
9. Ferguson LR, Lim IF, Pearson AE, Ralph J, Harris PJ: Bacterial antimutagenesis by hydroxycinnamic acids from plant cell walls. *Mutation Research* 2003; 542:49–58

10. Stagos D, Kazantzoglou G, Theofanidou D, Kakalopoulou G, Magiatis P, Mitaku S, Kouretas D: Activity of grape extracts from Greek varieties of *Vitis vinifera* against mutagenicity induced by bleomycin and hydrogen peroxide in *Salmonella typhimurium* strain TA102. *Mutation Research* 2006; 609 (2):165-175.
11. Nogueira ME, Passoni MH, Biso FI, Longo MC, Cardoso CRP, Santos LC, Varanda EA: Investigation of genotoxic and antigenotoxic activities of *Melampodium divaricatum* in *Salmonella typhimurium*. *Toxicology in Vitro* 2006; 20:(3) pp 361-366.
12. Maron DM, Ames BN: Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutation Research* 1983;113:173-215.
13. Bernstein L, Kaldor J, Mccann J, Pike MC: An empirical approach to the statistical analysis of mutagenesis data from the *Salmonella* test. *Mutation Research* 1982; 97 (4):267-281.
14. Varella SD, Pozzetti GL, Vilegas W, Varanda EA: Mutagenic activity in garbage from a aluminum products factory in *Salmonella*/microsome assay. *Toxicology in Vitro* 2004; 18 (6): 895-900.
15. Tachino N, Guo D, Daswood WM, Yamane S, Larsen R, Dashwood R: 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. *Mutation Research* 1994; 308:191-203.
16. Neigi PS, Jayaprakasha GK, Jena BS: Antioxidant and antimutagenic activities of pomegranate peel extracts. *Food Chemistry* 2003; 80:393–397.
17. Vargas VMF, Mota VEP, Henriques JAP: Mutagenic activity detected by the Ames test in river water under the influence of petrochemical industries. *Mutation Research* 1993; 319:31-45.

18. Mahato SB, Kundu AP: ^{13}C NMR Spectra of Pentacyclic triterpenoids – A compilation and some salient features. *Phytochemistry* 1994; 37: 1517-1575.
19. Kokate CK, Purohit AP, Gokhale SB: *Pharmacognosy*. 1st Ed. Pune, India: Nirali Prakashan. Analytical Pharmacognosy 1990, pp 105–137.
20. Wagner HM, Bladt S, Zgainski EM: *Plant drug analysis*. Springer, Berlin. 1984, pp 320.
21. Elvin-Lewis M: Should we be concerned about herbal remedies. *Journal of Ethnopharmacology* 2001; 75:141–164.
22. Ames, BN: Dietary carcinogens and anticarcinogens. *Science* 1983; 221: 1256-1264.
23. Reid K.A, Maes J, Maes A, Van Staden J, Kimpe NDe, Mulholland DA, and Verschaeve L: Evaluation of the mutagenic and antimutagenic effects of South African plants. *Journal of Ethnopharmacology* 2006; 106(1): 44-50.
24. Marques RCP, Medeiros SRB, Dias CS, Barbosa-Filho JM, Agnez-Lima LF: Evaluation of the mutagenic potential of yangambin and of the hydroalcoholic extract of *Ocotea duckei* by the Ames Test. *Mutation Research* 2003;536:117-120.
25. Niikawa M, Hayashi H, Sato T, Nagase H, Kito H: Isolation of substance from glossy privet (*Ligustrum lucidum* Ait). Inhibiting the mutagenicity of benzo (a) pyrene in bacteria. *Mutation Research* 1993; 319:1-9.
26. Guevara AP, Amor E, Russel G: Antimutagens from *Plumeria acuminata* Ait. *Mutation Research* 1996; 361(2-3):67-72.
27. 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* 2005; 53:(6):2312-5.

28. Resende FA, Barcala CAMA, Faria MCS, Kato FH, Cunha WR, Tavares DC: Antimutagenicity of ursolic acid and oleanolic acid against doxorubicin-induced clastogenesis in balb/c mice. *Life Sciences* 2006; 79:1268-1273.
29. Young HS, Chung HY, Lee CK, Park KI, Yokozawa T, Oura H: Ursolic acid inhibits aflatoxin B₁-induced mutagenicity in a *Salmonella* assay system. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 1994; 17(7):990-2
30. Saleem M, Afaq F, Adhami VM, Mukhtar H: Lupeol modulates NF- κ B and PI3K/Akt pathways and inhibits skin cancer in CD-1 mice. *Oncogene* 2004; 23:5203-5214.
31. Preetha SP, Kanniappan M, Selvakumar E, Nagaraj M, Varalakshmi P: Lupeol ameliorates aflatoxin B-1-induced peroxidative hepatic damage in rats. *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology* 2006; 143 (3):333-339.
32. Cardoso CR, Colus IMS, Bernardi CC, Sannomiya M, Vilegas W, Varanda EA: Mutagenic activity promoted by amentoflavone and methanol extract of *Byrsonima crassa* Niedenzu. *Toxicology* 2006; 225(1):55-63.
33. Sannomiya M, Cardoso CRP, Figueiredo MF, Rodrigues CM, Santos LC, Santos FV, Serpeloni JM, Cólus IMS, Vilegas W, Varanda EA: Mutagenic evaluation and chemical investigation of *Byrsonima intermedia* A. Juss. leaf extracts. *Journal of Ethnopharmacology* 2007; 112: 319-326.
34. Rietjens IMCM, Boersma MG, van der Woude H, Jeurissen SMF, Schutte ME, Alink GM: Flavonoids and alkenylbenzenes: Mechanisms of mutagenic action and carcinogenic risk. *Mutation Research* 2005; 574:124-138.
35. Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ: Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry* 2002;13:572-584.

36. Martínez A, Urios A, Blanco M: Mutagenicity of 80 chemicals in *Escherichia coli* tester strains IC203, deficient in oxyR, and its oxyRQ parent WP2 *uvra*/pkm101: Detection of 31 oxidative mutagens. *Mutation Research* 2000; 467:41-53.
37. Dauer A, Hensel A, Lhoste E, Knasmüller 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* 2003; 63: 199-207.
38. Yamakoshi J, Saito M, Kataoka S, Kikuchi M: Safety evaluation of proanthocyanidin-rich extract from grape seeds. *Food and Chemical Toxicology* 2002; 40: 599-607.
39. Bunkova R, Marova L, Nemec M: Antimutagenic properties of green tea. *Plant Food for Human Nutrition* 2005; 60:25-29.
40. Geetha T, Garg A, Chopra K, Kaur IP: Delineation of antimutagenic activity of catechin, epicatechin and green tea extract. *Mutation Research* 2004; 556: 65-74.
41. Park KY, Jung GO, Lee KT, Choi J, Choi MY, Kim GT, Jung HJ, Park HJ: Antimutagenic activity of flavonoids from the heartwood of *Rhus verniciflua*. *Journal of Ethnopharmacology* 2004; 90:73-79.
42. Kundu JK, Mossanda KS, Na H-K, Surh Y-J: Inhibitory effects of the extracts of *Sutherlandia frutescens* (L.) R. Br. and *Harpagophytum procumbens* DC. on phorbol ester-induced COX-2 expression in mouse skin: AP-1 and CREB as potential upstream targets, *Cancer Letters* 2004; 218:21–31.

Table 1. Mutagenic activity expressed by the mean and standard deviation of the number of revertants and mutagenicity ratio (value in parenthesis) in strains TA98, TA100, TA97a and TA102 of *S. typhimurium* exposed to several doses of chloroform and methanol extracts of *B. basiloba*, with (+S9) or without (-S9) metabolic evaluation.

Treatment (mg/plate)	TA98		TA100		TA97a		TA102	
	- S9	+ S9	- S9	+ S9	- S9	+ S9	- S9	+ S9
CHCl₃								
DMSO	37.0 ± 3.61	28.7 ± 4.5	106.3 ± 19.5	97.7 ± 4.7	112.5 ± 7.8	156.0 ± 11.5	291.3 ± 6.7	266.3 ± 31.6
1.99	43.7 ± 12.2 (1.2)	32.7 ± 3.5 (1.2)	119.3 ± 9.8 (1.1)	109.0 ± 10.5 (1.2)	120.0 ± 4.2 (1.1)	162.0 ± 8.9 (1.0)	248.0 ± 32.6 (0.8)	312.7 ± 10.4 (1.2)
3.97	36.3 ± 2.52 (1.0)	27.7 ± 3.5 (1.3)	123.3 ± 8.9 (1.2)	107.7 ± 16.6 (1.1)	133.0 ± 5.7 (1.2)	173.3 ± 10.7 (1.1)	274.3 ± 18.0 (0.9)	304.0 ± 21.0 (1.1)
7.95	41.0 ± 5.2 (1.1)	31.3 ± 7.5 (1.1)	130.0 ± 6.9 (1.2)	116.3 ± 24.6 (1.2)	126.5 ± 6.4 (1.1)	169.3 ± 20.0 (1.1)	201.7 ± 14.3 (0.7)	315.7 ± 18.5 (1.2)
11.92	34.7 ± 7.64 (0.9)	38.7 ± 2.5 (1.0)	126.3 ± 5.1 (1.2)	101.0 ± 13.1 (1.0)	138.0 ± 5.7 (1.2)	195.3 ± 24.7 (1.2)	232.0 ± 7.9 (0.8)	324.7 ± 22.2 (1.2)
15.90	36.7 ± 4.0 (1.0)	34.0 ± 3.6 (1.1)	126.7 ± 7.6 (1.2)	98.7 ± 4.2 (1.0)	154.0 ± 8.5 (1.4)	154.0 ± 10.5 (1.0)	214.0 ± 7.1 (0.7)	313.0 ± 13.5 (1.2)
MeOH								
DMSO	37.0 ± 3.61	28.7 ± 4.5	106.3 ± 19.5	97.7 ± 4.7	112.5 ± 7.8	156.0 ± 11.5	291.3 ± 6.7	266.3 ± 31.6
3.65	41.0 ± 5.2 (1.1)	32.7 ± 2.5 (1.1)	128.7 ± 7.6 (1.2)	92.3 ± 6.7 (0.9)	194.0 ± 1.4 (1.7)*	217.3 ± 20.0 (1.4)	293.7 ± 10.3 (1.0)	285.0 ± 12.8 (1.1)
7.30	28.3 ± 2.89 (0.8)	29.7 ± 4.0 (1.0)	122.0 ± 6.2(1.5)*	104.7 ± 5.9 (1.1)	167.0 ± 5.7 (1.5)*	267.0 ± 10.9(1.7)*	242.7 ± 11.1 (0.8)	293.0 ± 8.5 (1.1)
14.60	44.0 ± 19.2 (1.0)	30.7 ± 5.9 (1.1)	125.7 ± 12.9 (1.2)	Cytotoxic	100.5 ± 4.9 (0.9)	255.0 ± 6.0 (1.6)*	233.7 ± 31.2 (0.8)	285.3 ± 39.3 (1.1)
21.90	39.0 ± 9.54 (1.0)	33.0 ± 3.6 (1.1)	177.0 ± 11.8(1.7)*	Cytotoxic	Cytotoxic	138.7 ± 6.5 (0.9)	219.0 ± 28.3 (0.7)	292.3 ± 13.6 (1.1)
29.20	48.3 ± 3.06 (1.3)	33.0 ± 5.6 (1.1)	191.3 ± 26.0(1.8)*	Cytotoxic	Cytotoxic	140.3 ± 8.6 (0.9)	224.3 ± 9.1 (0.8)	291.7 ± 21.6 (1.1)
Control +	766.3 ± 76.3 ^a	1314.3 ± 143.1 ^b	1213.9 ± 107.8 ^c	1534.9 ± 176.1 ^b	1456.7 ± 122.9 ^a	1316.7 ± 197.9 ^b	1857.6 ± 121.2 ^d	1973.3 ± 231.1 ^b

DMSO: 100 µL/plate (negative control). Control + (positive control): ^a NPD (4-nitro-*o*-phenylenediamine – 10.0 µg/plate); ^b 2-Anthramine (1.25 µg/plate); ^c Sodium Azide (1.25 µg/plate); ^d Daunomycin (3.0 µg/plate). CHCl₃ – Chloroform Extract; MeOH – Methanol Extract. *P < 0.05.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Table 2. Antimutagenic activity expressed by the mean and standard deviation of the number of revertants and percentage of inhibition (value in parenthesis) of MeOH extract of *B. basiloba* with direct mutagenic compounds, using strains TA97a, TA98, TA100 and TA102 of *S. typhimurium*.

Strain	Mutagen	Extract concentration (mg/plate) Number of revertants (M±SD) (% inhibition)				
NPD						
		1.82	3.65	7.30	14.60	21.90
TA97a	810±30	318±80 (tox)	335±9 (tox)	94±30 (tox)	45±8 (tox)	22±3 (tox)
TA98	504±9	341±31 (32)	340±39 (32)	327±17 (35)	286±37 (43)	96±20 (81)
SAZ						
		1.82	3.65	7.30	14.60	21.90
TA100	2373±90	1770±130 (25)	2016±194 (15)	2074±12 (12)	1366±145 (tox)	495±130 (tox)
MMC						
		1.82	3.65	7.30	14.60	21.90
TA102	1737±77	1507±7 (13)	1558±85 (10)	1265±24 (27)	605±88 (65)	620±167 (64)
H ₂ O ₂						
		1.82	3.65	7.30	14.60	21.90
TA102	503±11	332±15 (34)	235±75 (53)	242±52 (52)	78±3 (tox)	67±2 (tox)

NPD (4-nitro-*o*-phenylenediamine – 10.0 µg/plate); SAZ (Sodium Azide -1.25 µg/plate); MMC (Mitomycin C - 0.5µg/plate); H₂O₂ (Hydrogen Peroxide – 0.034 mg/plate); Tox= viability < 60%

Table 3. Antimutagenic activity expressed by the mean and standard deviation of the number of revertants and percentage of inhibition (value in parenthesis) of MeOH extract of *B. basiloba* with indirect mutagenic compounds, using strains TA97a, TA98, TA100 and TA102 of *S. typhimurium*

Strain	Mutagen	Extract concentration (mg/plate) Number of revertants (M±SD) (% inhibition)				
AFL						
		0.46	0.91	1.83	3.65	7.30
TA97a						
	1182±45	276±12 (tox)	217±10 (tox)	245±12 (tox)	209±1.5 (tox)	199±25 (tox)
		1.82	3.65	7.30	14.60	21.90
TA98						
	613±16	199±24 (68)	164±14 (73)	194±13 (68)	145±16 (76)	119±17 (81)
		1.82	3.65	7.30	14.60	21.90
TA100						
	1627±77	254±16 (84)	228±12 (86)	179±8 (89)	128±16 (tox)	117±17 (tox)
B(a)P						
		0.46	0.91	1.82	3.65	7.30
TA97a						
	749±6	187±63 (tox)	210±13 (tox)	193±16 (tox)	191±15 (tox)	144±42 (tox)
		1.82	3.65	7.30	14.60	21.90
TA98						
	595±1	201±8 (66)	169±12 (72)	163±8 (73)	163±10 (73)	110±9 (82)
TA100						
	710±22	95±3 (tox)	96±11 (tox)	86±7 (tox)	53±3 (tox)	13±2 (tox)
H ₂ O ₂						
TA102						
	614±18	200±8 (68)	222±11 (64)	188±32 (tox)	133±32 (tox)	61±28 (tox)

H₂O₂ (Hydrogen Peroxide- 0.034mg/plate); AFL (Aflatoxin - 0.5µg/plate); B(a)P (Benzo(a)pyrene- 1µg/plate);
Tox= viability < 60%

Table 4. Antimutagenic activity expressed by the mean and standard deviation of the number of revertants and percentage of inhibition (value in parenthesis) of CHCl₃ extract of *B. basiloba* with direct mutagenic compounds, using strains TA97a, TA98, TA100 and TA102 of *S. typhimurium*.

Strain	Mutagen	Extract concentration (mg/plate) Number of revertants (M±SD) (% inhibition)				
NPD						
		0.99	1.99	3.97	7.95	15.90
TA97a						
	810±30	203±46 (75)	197±20 (76)	178±17 (78)	179±16 (78)	193±10 (76)
		0.99	1.99	3.97	7.95	15.90
TA98						
	504±9	341±31 (32)	340±39 (33)	327±17 (35)	286±37 (43)	196±20 (61)
		SAZ				
		0.99	1.99	3.97	7.95	15.90
TA100						
	2373±90	1770±130 (25)	2016±194 (15)	2074±12 (13)	1366±145 (44)	495±130 (79)
		MMC				
		0.99	1.99	3.97	7.95	15.90
TA102						
	1731±77	1724±182 (0.4)	1182±122 (32)	783±61 (55)	578±16 (67)	585±84 (66)
		H ₂ O ₂				
		0.99	1.99	3.97	7.95	15.90
TA102						
	503±11	418±29 (17)	493±56 (2)	418±26 (17)	392±13 (22)	270±28 (46)

NPD (4-nitro-*o*-phenylenediamine – 10.0 µg/plate); SA (Sodium Azide -1.25 µg/plate); MMC (Mitomycin C - 0.5µg/plate); H₂O₂ (Hydrogen Peroxide – 0.034 mg/plate); Tox= viability < 60%

Table 5. Antimutagenic activity expressed by the mean and standard deviation of the number of revertants and percentage of inhibition (value in parenthesis) of CHCl_3 extract of *B. basiloba* with indirect mutagenic compounds, using strains TA97a, TA98, TA100 of *S. typhimurium*.

Strain	Mutagen	Extract concentration (mg/plate) Number of revertants (M±SD) (% inhibition)				
B(a)P						
		0.99	1.99	3.97	7.95	15.90
TA97a						
	749±	676±10 (10)	289±14 (61)	164±14 (78)	178±9 (76)	165±13 (78)
TA98						
	595±1	259±11 (56)	212±4 (64)	208±13 (65)	258±13 (56)	197±9 (66)
TA100						
	710±22	350±15 (tox)	253±16 (tox)	85±16 (tox)	74±11 (tox)	23±2.3 (tox)
AFL						
		0.99	1.99	3.97	7.95	15.90
TA97a						
	1128±45	276±12 (tox)	217±10 (tox)	245±12 (tox)	209±1.5 (tox)	199±2.5 (tox)
		0.99	1.99	3.97	7.95	15.90
TA98						
	613±16	211±2 (66)	183±18 (70)	186±7 (70)	179±4 (70)	158±4 (74)
		0.99	1.99	3.97	7.95	15.9
TA100						
	1627±75	223±16 (tox)	169±16 (tox)	121±19 (tox)	194±84 (tox)	134±9 (tox)
H ₂ O ₂						
		0.99	1.99	3.97	7.95	15.90
TA102						
	614±18	254±18 (59)	269±31 (56)	267±6 (57)	234±13 (62)	261±24 (57)

H₂O₂ (Hydrogen Peroxide- 0.034 mg/plate); AFL (Aflatoxin - 0.5µg/plate); B(a)P (Benzo(a)pyrene- 1µg/plate); Tox= viability < 60%

Table 6. Content of the main flavonoids from *Byrsonima basiloba*.

Compounds	Content (mg g ⁻¹ of methanol extract)*
NI	2.20
Q3OGal	3.82
NI	1.83
Q3O(2''Galloyl)Gal	0.17
Q3OAra	2.97
Q	0.53
Amentoflavone	1.79
Total flavonoids	13.31

Q3OGal = quercetin-3-*O*-β-galactopyranoside; Q3OAra = quercetin-3-*O*-α-arabinopyranoside; Q3O(2''Galloyl)Gal = quercetin-3-*O*-(2''-*O*-galloyl)-β-galactopyranoside; Q3O(2''Galloyl)Ara = quercetin-3-*O*-(2''-*O*-galloyl)-α-arabinopyranoside; Q = quercetin. NI = not identified.
* Flavonoids contents determined by HPLC-UV-PDA.

Table 1. Mutagenic activity expressed by the mean and standard deviation of the number of revertants and mutagenicity ratio (value in parenthesis) in strains TA98, TA100, TA97a and TA102 of *S. typhimurium* exposed to several doses of chloroform and methanol extracts of *B. basiloba*, with (+S9) or without (-S9) metabolic evaluation.

Treatment (mg/plate)	TA98		TA100		TA97a		TA102	
	- S9	+ S9	- S9	+ S9	- S9	+ S9	- S9	+ S9
CHCl₃								
DMSO	37.0 ± 3.61	28.7 ± 4.5	106.3 ± 19.5	97.7 ± 4.7	112.5 ± 7.8	156.0 ± 11.5	291.3 ± 6.7	266.3 ± 31.6
1.99	43.7 ± 12.2 (1.2)	32.7 ± 3.5 (1.2)	119.3 ± 9.8 (1.1)	109.0 ± 10.5 (1.2)	120.0 ± 4.2 (1.1)	162.0 ± 8.9 (1.0)	248.0 ± 32.6 (0.8)	312.7 ± 10.4 (1.2)
3.97	36.3 ± 2.52 (1.0)	27.7 ± 3.5 (1.3)	123.3 ± 8.9 (1.2)	107.7 ± 16.6 (1.1)	133.0 ± 5.7 (1.2)	173.3 ± 10.7 (1.1)	274.3 ± 18.0 (0.9)	304.0 ± 21.0 (1.1)
7.95	41.0 ± 5.2 (1.1)	31.3 ± 7.5 (1.1)	130.0 ± 6.9 (1.2)	116.3 ± 24.6 (1.2)	126.5 ± 6.4 (1.1)	169.3 ± 20.0 (1.1)	201.7 ± 14.3 (0.7)	315.7 ± 18.5 (1.2)
11.92	34.7 ± 7.64 (0.9)	38.7 ± 2.5 (1.0)	126.3 ± 5.1 (1.2)	101.0 ± 13.1 (1.0)	138.0 ± 5.7 (1.2)	195.3 ± 24.7 (1.2)	232.0 ± 7.9 (0.8)	324.7 ± 22.2 (1.2)
15.90	36.7 ± 4.0 (1.0)	34.0 ± 3.6 (1.1)	126.7 ± 7.6 (1.2)	98.7 ± 4.2 (1.0)	154.0 ± 8.5 (1.4)	154.0 ± 10.5 (1.0)	214.0 ± 7.1 (0.7)	313.0 ± 13.5 (1.2)
MeOH								
DMSO	37.0 ± 3.61	28.7 ± 4.5	106.3 ± 19.5	97.7 ± 4.7	112.5 ± 7.8	156.0 ± 11.5	291.3 ± 6.7	266.3 ± 31.6
3.65	41.0 ± 5.2 (1.1)	32.7 ± 2.5 (1.1)	128.7 ± 7.6 (1.2)	92.3 ± 6.7 (0.9)	194.0 ± 1.4 (1.7)*	217.3 ± 20.0 (1.4)	293.7 ± 10.3 (1.0)	285.0 ± 12.8 (1.1)
7.30	28.3 ± 2.89 (0.8)	29.7 ± 4.0 (1.0)	122.0 ± 6.2 (1.5)*	104.7 ± 5.9 (1.1)	167.0 ± 5.7 (1.5)*	267.0 ± 10.9 (1.7)*	242.7 ± 11.1 (0.8)	293.0 ± 8.5 (1.1)
14.60	44.0 ± 19.2 (1.0)	30.7 ± 5.9 (1.1)	125.7 ± 12.9 (1.2)	Cytotoxic	100.5 ± 4.9 (0.9)	255.0 ± 6.0 (1.6)*	233.7 ± 31.2 (0.8)	285.3 ± 39.3 (1.1)
21.90	39.0 ± 9.54 (1.0)	33.0 ± 3.6 (1.1)	177.0 ± 11.8 (1.7)*	Cytotoxic	Cytotoxic	138.7 ± 6.5 (0.9)	219.0 ± 28.3 (0.7)	292.3 ± 13.6 (1.1)
29.20	48.3 ± 3.06 (1.3)	33.0 ± 5.6 (1.1)	191.3 ± 26.0 (1.8)*	Cytotoxic	Cytotoxic	140.3 ± 8.6 (0.9)	224.3 ± 9.1 (0.8)	291.7 ± 21.6 (1.1)
Control +	766.3 ± 76.3 ^a	1314.3 ± 143.1 ^b	1213.9 ± 107.8 ^c	1534.9 ± 176.1 ^b	1456.7 ± 122.9 ^a	1316.7 ± 197.9 ^b	1857.6 ± 121.2 ^d	1973.3 ± 231.1 ^b

DMSO: 100 µL/plate (negative control). Control + (positive control): ^a NPD (4-nitro-*o*-phenylenediamine – 10.0 µg/plate); ^b 2-Anthramine (1.25 µg/plate); ^c Sodium Azide (1.25 µg/plate); ^d Daunomycin (3.0 µg/plate). CHCl₃ – Chloroform Extract; MeOH – Methanol Extract. *P < 0.05.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Table 2. Antimutagenic activity expressed by the mean and standard deviation of the number of revertants and percentage of inhibition (value in parenthesis) of MeOH extract of *B. basiloba* with direct mutagenic compounds, using strains TA97a, TA98, TA100 and TA102 of *S. typhimurium*.

Strain	Mutagen	Extract concentration (mg/plate) Number of revertants (M±SD) (% inhibition)				
NPD						
		1.82	3.65	7.30	14.60	21.90
TA97a	810±30	318±80 (tox)	335±9 (tox)	94±30 (tox)	45±8 (tox)	22±3 (tox)
TA98	504±9	341±31 (32)	340±39 (32)	327±17 (35)	286±37 (43)	96±20 (81)
SAZ						
		1.82	3.65	7.30	14.60	21.90
TA100	2373±90	1770±130 (25)	2016±194 (15)	2074±12 (12)	1366±145 (tox)	495±130 (tox)
MMC						
		1.82	3.65	7.30	14.60	21.90
TA102	1737±77	1507±7 (13)	1558±85 (10)	1265±24 (27)	605±88 (65)	620±167 (64)
H ₂ O ₂						
		1.82	3.65	7.30	14.60	21.90
TA102	503±11	332±15 (34)	235±75 (53)	242±52 (52)	78±3 (tox)	67±2 (tox)

NPD (4-nitro-*o*-phenylenediamine – 10.0 µg/plate); SAZ (Sodium Azide -1.25 µg/plate); MMC (Mitomycin C - 0.5µg/plate); H₂O₂ (Hydrogen Peroxide – 0.034 mg/plate); Tox= viability < 60%

Table 3. Antimutagenic activity expressed by the mean and standard deviation of the number of revertants and percentage of inhibition (value in parenthesis) of MeOH extract of *B. basiloba* with indirect mutagenic compounds, using strains TA97a, TA98, TA100 and TA102 of *S. typhimurium*

Strain	Mutagen	Extract concentration (mg/plate) Number of revertants (M±SD) (% inhibition)				
AFL						
		0.46	0.91	1.83	3.65	7.30
TA97a						
	1182±45	276±12 (tox)	217±10 (tox)	245±12 (tox)	209±1.5 (tox)	199±25 (tox)
		1.82	3.65	7.30	14.60	21.90
TA98						
	613±16	199±24 (68)	164±14 (73)	194±13 (68)	145±16 (76)	119±17 (81)
		1.82	3.65	7.30	14.60	21.90
TA100						
	1627±77	254±16 (84)	228±12 (86)	179±8 (89)	128±16 (tox)	117±17 (tox)
B(a)P						
		0.46	0.91	1.82	3.65	7.30
TA97a						
	749±6	187±63 (tox)	210±13 (tox)	193±16 (tox)	191±15 (tox)	144±42 (tox)
		1.82	3.65	7.30	14.60	21.90
TA98						
	595±1	201±8 (66)	169±12 (72)	163±8 (73)	163±10 (73)	110±9 (82)
TA100						
	710±22	95±3 (tox)	96±11 (tox)	86±7 (tox)	53±3 (tox)	13±2 (tox)
H ₂ O ₂						
TA102						
	614±18	200±8 (68)	222±11 (64)	188±32 (tox)	133±32 (tox)	61±28 (tox)

H₂O₂ (Hydrogen Peroxide- 0.034mg/plate); AFL (Aflatoxin - 0.5 μ g/plate); B(a)P (Benzo(a)pyrene- 1 μ g/plate);
Tox= viability < 60%

Table 4. Antimutagenic activity expressed by the mean and standard deviation of the number of revertants and percentage of inhibition (value in parenthesis) of CHCl₃ extract of *B. basiloba* with direct mutagenic compounds, using strains TA97a, TA98, TA100 and TA102 of *S. typhimurium*.

Strain	Mutagen	Extract concentration (mg/plate) Number of revertants (M±SD) (% inhibition)				
NPD						
		0.99	1.99	3.97	7.95	15.90
TA97a						
	810±30	203±46 (75)	197±20 (76)	178±17 (78)	179±16 (78)	193±10 (76)
		0.99	1.99	3.97	7.95	15.90
TA98						
	504±9	341±31 (32)	340±39 (33)	327±17 (35)	286±37 (43)	196±20 (61)
		SAZ				
		0.99	1.99	3.97	7.95	15.90
TA100						
	2373±90	1770±130 (25)	2016±194 (15)	2074±12 (13)	1366±145 (44)	495±130 (79)
		MMC				
		0.99	1.99	3.97	7.95	15.90
TA102						
	1731±77	1724±182 (0.4)	1182±122 (32)	783±61 (55)	578±16 (67)	585±84 (66)
		H ₂ O ₂				
		0.99	1.99	3.97	7.95	15.90
TA102						
	503±11	418±29 (17)	493±56 (2)	418±26 (17)	392±13 (22)	270±28 (46)

NPD (4-nitro-*o*-phenylenediamine – 10.0 µg/plate); SA (Sodium Azide -1.25 µg/plate); MMC (Mitomycin C - 0.5µg/plate); H₂O₂ (Hydrogen Peroxide – 0.034 mg/plate); Tox= viability < 60%

Table 5. Antimutagenic activity expressed by the mean and standard deviation of the number of revertants and percentage of inhibition (value in parenthesis) of CHCl_3 extract of *B. basiloba* with indirect mutagenic compounds, using strains TA97a, TA98, TA100 of *S. typhimurium*.

Strain	Mutagen	Extract concentration (mg/plate) Number of revertants (M±SD) (% inhibition)				
B(a)P						
		0.99	1.99	3.97	7.95	15.90
TA97a	749±	676±10 (10)	289±14 (61)	164±14 (78)	178±9 (76)	165±13 (78)
TA98	595±1	259±11 (56)	212±4 (64)	208±13 (65)	258±13 (56)	197±9 (66)
TA100	710±22	350±15 (tox)	253±16 (tox)	85±16 (tox)	74±11 (tox)	23±2.3 (tox)
AFL						
		0.99	1.99	3.97	7.95	15.90
TA97a	1128±45	276±12 (tox)	217±10 (tox)	245±12 (tox)	209±1.5 (tox)	199±2.5 (tox)
		0.99	1.99	3.97	7.95	15.90
TA98	613±16	211±2 (66)	183±18 (70)	186±7 (70)	179±4 (70)	158±4 (74)
		0.99	1.99	3.97	7.95	15.9
TA100	1627±75	223±16 (tox)	169±16 (tox)	121±19 (tox)	194±84 (tox)	134±9 (tox)
H ₂ O ₂						
		0.99	1.99	3.97	7.95	15.90
TA102	614±18	254±18 (59)	269±31 (56)	267±6 (57)	234±13 (62)	261±24 (57)

H₂O₂ (Hydrogen Peroxide- 0.034 mg/plate); AFL (Aflatoxin - 0.5 μ g/plate); B(a)P (Benzo(a)pyrene- 1 μ g/plate);
Tox= viability < 60%

Table 6. Content of the main flavonoids from *Byrsonima basiloba*.

Compounds	Content (mg g ⁻¹ of methanol extract)*
NI	2.20
Q3OGal	3.82
NI	1.83
Q3O(2''Galloyl)Gal	0.17
Q3OAra	2.97
Q	0.53
Amentoflavone	1.79
Total flavonoids	13.31

Q3OGal = quercetin-3-*O*-β-galactopyranoside; Q3OAra = quercetin-3-*O*-α-arabinopyranoside; Q3O(2''Galloyl)Gal = quercetin-3-*O*-(2''-*O*-galloyl)-β-galactopyranoside; Q3O(2''Galloyl)Ara = quercetin-3-*O*-(2''-*O*-galloyl)-α-arabinopyranoside; Q = quercetin. NI = not identified.
* Flavonoids contents determined by HPLC-UV-PDA.