

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

Avaliação da atividade mutagênica e fitoestrogênica das plantas *Davilla nitida*
Vahl. e *Davilla elliptica* St. Hil (Dilleniaceae)

Orientadora: Prof. Dra. Eliana Aparecida Varanda
Orientada: Fabiana Izilda Bisio

Araraquara-2008

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

Avaliação da atividade mutagênica e fitoestrogênica das plantas *Davilla nitida*
Vahl. e *Davilla elliptica* St. Hil (Dilleniaceae)

Fabiana Izilda Bisio

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia
aplicadas à Farmácia (Área de Concentração
em Microbiologia), da Faculdade de Ciências
Farmacêuticas da Universidade Estadual
Paulista, como requisito parcial para a
obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof. Dra. Eliana Aparecida
Varanda

Araraquara-2008

Ficha Catalográfica

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

B622a Biso, Fabiana Izilda
Avaliação da atividade mutagênica e fitoestrogênica das plantas *Davilla nitida* Vahl e *Davilla elliptica* St. Hil (Dilleniaceae). / Fabiana Izilda Biso.
– Araraquara, 2008.
163 f.

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

1.Flavonóides. 2.Mutagenicidade. 3.Fitoestrogenicidade. I.Varanda, Eliana Aparecida, orient. II. Título.

CAPES: 403000005

Apresentação

Esse trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Mutagênese do Departamento de
Ciências Biológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da
Universidade Estadual Paulista (UNESP)
- Campus de Araraquara

Dedicatória

Ao meu pai, Wanderley, e ao meu irmão, Mi (*in memorian*),
pois eu sei que mesmo estando no plano espiritual vocês sempre foram presenças
constantes, orientando e consolando.

Saudades eternas!!

À minha mãe Luzia, aos meus irmãos, Sandra e Cláudio e à minha cunhada, Silvana,
fundamentalmente, por serem a minha família.

Por sempre terem acreditado que valia a pena investir nesse sonho e me apoiarem
incondicionalmente.

Essa conquista é tão de vocês quanto minha!!

Aos meus sobrinhos Camilinha, Rafa, Olavo e Emanuelle,
por serem doces presenças juvenis e infantis que tornam mais suaves as tristes fases da
vida, como também fazem mais prazerosos os momentos de satisfação.

Vocês são os meus amores mais lindos!!

*“E a vida vai tecendo laços,
Quase impossíveis de romper:
Tudo que amamos são pedaços,
vivos de nosso próprio ser.”
Manoel Bandeira*

Agradecimientos

A Deus,

Eu agradeço:

*pela coragem de facear as dificuldades criadas por mim mesma,
pelas provas que me aperfeiçoam o raciocínio e me abrandam o coração;
pela fé na imortalidade;
pelo privilégio de servir;
pelo dom de saber que sou responsável pelas minhas ações;
pelos recursos nutrientes e curativos que trago em mim;
pelo reconforto de reconhecer que a minha felicidade tem o tamanho da
felicidade que faço para os outros;
pelo discernimento que me permite diferenciar aquilo que me é útil daquilo que
não me serve;
pelo amparo da afeição no qual a minha vida se alimenta em permuta
constante;
pela bênção da oração que me faculta apoio interior para a solução de meus
problemas
pela tranquilidade de consciência que ninguém me pode subtrair...
Por tudo isso, e por todos os demais tesouros de esperança e amor, alegria e paz
de que me enriquecem a existência,*

*sê bendito, Senhor, ao mesmo tempo que te louvo a Infinita Misericórdia,
hoje e para sempre.*

Que assim seja !!

Emmanuel/Francisco Cândido Xavier

À Professora Eliana Aparecida Varanda, por ter me iniciado na pesquisa e ter aceitado orientar esse trabalho. Pela confiança depositada, pelo conhecimento compartilhado, pela paciência dispensada, por ter me ensinado sobre ciência e sobre vida. Foi uma satisfação trabalharmos juntas!!

Ao Programa Biota, na pessoa do Professor Wagner Vilegas, e à FAPESP, por todo suporte que proporcionou a realização desse trabalho.

Aos professores e alunos do Departamento de Biofísica e Biometria do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da UERJ, Professor Adriano Caldeira-de-Araújo, Professor Flávio Dantas, ao Paulo Thiago, ao Eric e, em especial, ao Professor José Carlos Pelielo de Mattos, por terem me ensinado grande parte deste trabalho e terem sido extremamente receptivos, solícitos e atenciosos.

Às Professoras Lourdes Campaner dos Santos e Lusânia Gregg Antunes, por terem aceitado compor a Banca Examinadora do Exame de Qualificação deste trabalho, cujas sugestões o engrandeceram significativamente.

Aos meus veteranos do Laboratório de Mutagênese, Soraya, Fábio e Walclécio, que muito me ensinaram sobre o teste de Ames e sempre me ofereceram companhias agradáveis.

Aos meus contemporâneos do Laboratório de Mutagênese, Mari e Maira, por termos compartilhado várias aventuras no laboratório, Tuga, Cássia, por ter me “apresentado” o teste E-Screen, Vanessa, por ter me “apresentado” a cultura de células, Ana Paula, Aline, Flávia, por sempre estarem dispostas a ajudar.

À Mari, pela sua simplicidade, bondade e doçura. Apesar do pouco tempo que trabalhamos juntas, você me ensinou muitíssimas coisas.

Ao Dr. Clenilson Martins Rodrigues e ao Ms. Daniel Rinaldo, por terem disponibilizado todo o conhecimento fitoquímico sobre as espécies aqui estudadas, o que foi fundamental para a compreensão dos resultados.

Ao Dr. Marcelo Silva, por ter compartilhado seus conhecimentos e ajudado a esclarecer várias dúvidas que surgiram ao longo deste trabalho. Sua ajuda e suas sugestões foram importantíssimas.

À Professora Clarice Queico, por ter aberto as portas do seu laboratório, e à sua equipe, Carol, Zé, Karina, e em especial, ao Adolfo e ao Fernando, por serem tão disponíveis e solícitos em ajudar. Sem o apoio de vocês não teria sido possível obter a maior parte dos resultados aqui apresentados.

À Berna, Marisa, Néia e Sílvia, por tudo que me ensinaram e ajudaram.

À Fê, por sempre ter me entendido sem eu precisar falar, à Carol, por sempre ter sido o sol da tempestade, à Cami, Cassinha, Daysi, Débora, Geovana, Katiúscia, Silvinha, por todos os momentos de diversão (que foram muitos, com muita diversão), por sempre terem me incentivado e estimulado. Vocês são minhas amigas para sempre!!

Ao meu namorado Rafael, que deixou de ser só meu namorado, para ser também meu parceiro, por ter sido conforto nos momentos desanimadores e por incentivar os próximos passos. Espero que fiquemos juntos por muito tempo para compartilharmos o nosso sucesso!!

Às minhas amigas de república, Amanda, Mileide, Ton, Val, Joyce e Andressa. Muito obrigada pelos bons tempos de convivência, pelos ensinamentos, pela amizade. Vocês foram pessoas maravilhosas que Deus colocou na minha vida e, embora agora geograficamente distantes, vocês continuam sendo muito importantes!!

Às funcionárias da seção de pós-graduação, pela orientação e atenção dispensadas.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas, pela formação acadêmica e pelo espírito científico.

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pela concessão da bolsa de estudo.

A todos aqueles que não foram citados e, de alguma maneira, contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito obrigado!!

“O que vale na vida não é o ponto de partida e sim a caminhada. Caminhando e semeando, no fim, terás o que colher”.

Cora Coralina

CAPÍTULO I

Resumo

Abstract

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

1. Introdução	27
2. Proposição	44
3. Objetivos específicos	46
4. Material e Métodos	48
4.1. Obtenção do material vegetal	49
4.2. Obtenção dos extratos, frações e compostos isolados de <i>Davilla nitida</i> Vahl. e <i>D. elliptica</i> St. Hil	49
4.2.1. Obtenção dos extratos de <i>Davilla nitida</i> Vahl. e <i>D. elliptica</i> St. Hil e análise fitoquímica	49
4.2.2. Obtenção das frações do extrato metanólico de <i>Davilla nitida</i> Vahl. e <i>D. elliptica</i> St. Hil	51
4.2.3. Obtenção dos compostos isolados obtidos a partir de <i>D. elliptica</i> St. Hil	51
4.3. Reagentes	52
4.4. Teste de Ames.....	53

4.4.1. Linhagens utilizadas.....	53
4.4.2. Verificação das características genéticas das cepas de <i>S. typhimurium</i>	54
4.4.3. Preparo dos inóculos de <i>S. typhimurium</i> utilizados no ensaio	54
4.4.4. Meios de cultura	54
4.4.5. Preparo da mistura de S9	55
4.4.6. Controles	56
4.4.7. Ensaio de mutagenicidade	56
4.4.8. Análise dos resultados	57
4.5. Ensaio com plasmídeo pUC9.1	58
4.5.1. Linhagem bacteriana e plasmídeo	58
4.5.2. Preparo dos inóculos de <i>Escherichia coli</i>	58
4.5.3. Soluções e meio de cultura	59
4.5.4. Preparação plasmidial	59
4.5.5. Preparo das amostras e eletroforese	60
4.5.6. Controles	61
4.5.7. Análise dos géis	61
4.6. Ensaio de proliferação com células MCF-7 (teste E-Screen)	63
4.6.1. Meios de cultura e soluções	63
4.6.2. Linhagem celular e condições de cultivo das células	64
4.6.3. Remoção de estrógenos endógenos através do tratamento do soro fetal bovino com Carvão-Dextrana.....	65
4.6.4. Ensaio de citotoxicidade	65

4.6.5. Ensaio E-Screen	66
4.6.6. Controles e curvas hormonais	68
4.6.7. Ensaio da Sulforodamina B	68
4.6.8. Análise estatística	69
5. Resultados	70
5.1. Teste de Ames	71
5.1.1. Teste de Ames com extratos e frações de <i>D. nitida</i>	71
5.1.2. Teste de Ames com extratos e frações de <i>D. elliptica</i>	75
5.2. Ensaio com plasmídeo pUC9.1	78
5.3. Ensaio de proliferação com células MCF-7 (teste E-Screen)	95
5.3.1. Ensaio de citotoxicidade	95
5.3.2. Ensaio E-Screen	97
6. Discussão.....	99
6.1. Mutagenicidade.....	100
6.2. Fitoestrogenicidade.....	114
7. Conclusões.....	121
8. Referências Bibliográficas.....	124

CAPÍTULO II

Mutagenic activity of <i>Davilla nitida</i> and <i>Davilla elliptica</i> evaluated in Ames and mice micronucleus tests	140
--	-----

Capítulo I

Resumo

Davilla nitida Vahl. e *D. elliptica* St. Hil (Dilleniaceae) são plantas distribuídas, predominantemente, no Cerrado Brasileiro, utilizadas, na medicina popular, para tratar distúrbios gástricos, intestinais e inchaços, principalmente na região dos testículos e linfonodos. Considerando a importância de investigar os efeitos farmacológicos e toxicológicos de espécies vegetais utilizadas com fins terapêuticos, que podem tornar-se alvo na pesquisa de novos fármacos, foi objetivo do presente trabalho avaliar a atividade fitoestrogênica e genotóxica dessas duas espécies de *Davilla*, utilizando, para tanto, ensaios de proliferação celular com células MCF-7 de tumor de mama humano, ensaios de mutação gênica reversa com *Salmonella typhimurium* (teste de Ames) e ensaios com plasmídeo pUC9.1, para analisar quebras nas fitas de DNA. A atividade fitoestrogênica de flavonóides isolados de *D. elliptica* (quercetina, quercetina-3-O- α -L-rhamnopiranosídeo, miricetina e miricetina-3-O- α -L-rhamnopiranosídeo) não pôde ser propriamente caracterizada devido ao perfil de resposta da linhagem celular MCF-7, utilizada nos ensaios de proliferação. No teste de Ames, os extratos metanólico, hidroalcoólico e a fração acetato de etila de *D. nitida*, bem como os extratos metanólico, etanólico e clorofórmico de *D. elliptica* induziram mutações nas linhagens de *S. typhimurium*. Na presença de cobre, as frações aquosa e acetato de etila das duas plantas, e as substâncias puras, quercetina, quercetina-3-O- α -L-rhamnopiranosídeo, miricetina, miricetina-3-O- α -L-rhamnopiranosídeo e ácido gálico, isoladas de *D. elliptica*, apresentaram potencial genotóxico, promovendo quebras nas cadeias do DNA, em ensaios realizados com plasmídeo pUC9.1. Tais respostas são compatíveis com a literatura, que relata que algumas classes de metabólitos secundários

vegetais são capazes de desempenhar atividade mutagênica e genotóxica, em células procarióticas e eucarióticas.

Palavras-chave: plantas medicinais, *Davilla nitida*, *Davilla elliptica*, flavonóides, fitoestrogenicidade, células MCF-7, mutagenicidade, *Salmonella typhimurium*, genotoxicidade, quebras nas fitas de DNA.

Abstract

Davilla nitida Vahl. and *Davilla elliptica* St. Hil (Dilleniaceae) are plants distributed predominantly in Brazilian *cerrado* region and they are used in popular medicine to treat stomach diseases, diarrhea and swelling, particularly of the lymph nodes and testicles. Considering the importance of investigations about pharmacological and toxic effects of vegetable species used as therapeutic drugs, that may become target on new drugs research, the aim of this work was to evaluate the phytoestrogenic and genotoxic activities of both *Davilla* species, using human breast tumor MCF-7 cell proliferation assay, *Salmonella* mutagenicity assay (Ames test) and DNA strand break analysis in pUC9.1 plasmid DNA. Phytoestrogenic activity of flavonoids isolated from *D. elliptica* (quercetin, quercetin-3-O- α -L-rhamnopyranoside, myricetin and myricetin-3-O- α -L-rhamnopyranoside) could not be determined because of the response profile of MCF-7 cell line used in the proliferation assays. In Ames test, methanolic, ethanolic extracts and ethyl acetate fraction of *D. nitida* and methanolic, ethanolic and chloroformic extracts of *D. elliptica* induced mutations in *S. typhimurium* strains. In the presence of copper, aqueous and ethyl acetate fraction of the plants, and compounds, quercetin, quercetin-3-O- α -L-rhamnopyranoside, myricetin, myricetin-3-O- α -L-rhamnopyranoside and gallic acid, isolated from *D. elliptica*, showed genotoxic potencial, generating DNA strand breaks in plasmid pUC9.1. Such results are compatible to the literature, which reports that some classes of vegetable secondary metabolites are capable of carrying out mutagenic and genotoxic activities to prokaryotic and eukaryotic cells.

Keywords: medicinal plants, *Davilla nitida*, *Davilla elliptica*, flavonoids, phytoestrogenicity, MCF-7 cells, mutagenicity, *Salmonella typhimurium*, genotoxicity, DNA strand breaks.

Lista de Figuras

Figura 1: Estrutura química dos principais estrógenos esteroidais	29
Figura 2: Modelo do mecanismo de ação dos estrógenos.....	30
Figura 3: Estrutura química de alguns moduladores seletivos dos receptores de estrógenos.....	32
Figura 4: Estrutura química de isoflavonóides.....	33
Figura 5: Estrutura química das principais classes de flavonóides.....	33
Figura 6: Folhas, frutos e inflorescência de <i>D. nitida</i>	43
Figura 7: Folhas e frutos de <i>D. elliptica</i>	43
Figura 8. Eletroforese em gel de agarose a 0,8% e análise densitométrica das concentrações das conformações superhelicoidizada (SH), circular aberta (CA) e linear (L) do plasmídeo pUC9.1, após tratamento com a fração acetato de etila de <i>D. nitida</i>	82
Figura 9. Eletroforese em gel de agarose a 0,8% e análise densitométrica das concentrações das conformações superhelicoidizada (SH), circular aberta (CA) e linear (L) do plasmídeo pUC9.1, após tratamento com a fração acetato de etila de <i>D. elliptica</i>	83
Figura 10. Eletroforese em gel de agarose a 0,8%, previamente corado com excesso de brometo de etídeo, e análise densitométrica das concentrações das conformações superhelicoidizada (SH), circular aberta (CA) e linear (L) do plasmídeo pUC9.1, após tratamento com a fração acetato de etila de <i>D. nitida</i>	84

Figura 11. Eletroforese em gel de agarose a 0,8%, previamente corado com excesso de brometo de etídeo, e análise densitométrica das concentrações das conformações superhelicoidizada (SH), circular aberta (CA) e linear (L) do plasmídeo pUC9.1, após tratamento com a fração acetato de etila de *D. elliptica*..... 85

Figura 12. Eletroforese em gel de agarose a 0,8%, análise densitométrica das concentrações das conformações superhelicoidizada (SH), circular aberta (CA) e linear (L) do plasmídeo pUC9.1 e número de quebras/genoma no DNA plasmidial, após tratamento com a fração aquosa de *D. nitida*..... 86

Figura 13. Eletroforese em gel de agarose a 0,8%, análise densitométrica das concentrações das conformações superhelicoidizada (SH), circular aberta (CA) e linear (L) do plasmídeo pUC9.1 e número de quebras/genoma no DNA plasmidial, após tratamento com a fração aquosa de *D. elliptica*..... 87

Figura 14. Eletroforese em gel de agarose a 0,8%, análise densitométrica das concentrações das conformações superhelicoidizada (SH), circular aberta (CA) e linear (L) do plasmídeo pUC9.1 e número de quebras/genoma no DNA plasmidial, após tratamento com quercetina..... 88

Figura 15. Eletroforese em gel de agarose a 0,8%, análise densitométrica das concentrações das conformações superhelicoidizada (SH), circular aberta (CA) e linear (L) do plasmídeo pUC9.1 e número de quebras/genoma no DNA plasmidial, após tratamento com quercetina-3-O- α -L-rhamnopiranosídeo (quercetrina)..... 89

Figura 16. Eletroforese em gel de agarose a 0,8%, análise densitométrica das concentrações das conformações superhelicoidizada (SH), circular aberta (CA) e linear (L) do plasmídeo pUC9.1 e número de quebras/genoma no DNA plasmidial, após tratamento com miricetina..... 90

Figura 17. Eletroforese em gel de agarose a 0,8%, análise densitométrica das concentrações das conformações superhelicoidizada (SH), circular aberta (CA) e linear (L) do plasmídeo pUC9.1 e número de quebras/genoma no DNA plasmidial, após tratamento com miricetina-3-O- α -L-rhamnopyranosídeo (miricetrina).....	91
Figura 18. Eletroforese em gel de agarose a 0,8%, análise densitométrica das concentrações das conformações superhelicoidizada (SH), circular aberta (CA) e linear (L) do plasmídeo pUC9.1 e número de quebras/genoma no DNA plasmidial, após tratamento com ácido gálico.....	92
Figura 19. Eletroforese em gel de agarose a 0,8%, análise densitométrica das concentrações das conformações superhelicoidizada (SH), circular aberta (CA) e linear (L) do plasmídeo pUC9.1 e número de quebras/genoma no DNA plasmidial, após tratamento com flavonóides e ácido gálico na presença de cobre	93
Figura 20. Eletroforese em gel de agarose a 0,8% e análise densitométrica das concentrações das conformações superhelicoidizada (SH), circular aberta (CA) e linear (L) do plasmídeo pUC9.1, após tratamento com frações acetato de etila e aquosa de <i>D. nitida</i> e <i>D. elliptica</i> , na presença de cobre	94
Figura 21. Efeito da quercetina, quercetina-3-O- α -L-rhamnopyranosídeo (quercetrina), miricetina e miricetina-3-O- α -L-rhamnopyranosídeo (miricetrina) sobre a viabilidade das células MCF-7.....	96
Figura 22. Efeito do 17- β -estradiol e dos principais flavonóides isolados das folhas de <i>D. elliptica</i> sobre a proliferação das células MCF-7.....	98
Figura 23: Estrutura geral dos flavonóis.....	105
Figura 24. Isomerização da quercetina a quinona/quinona metídica.....	107
Figura 25: Substâncias isoladas da infusão das folhas de <i>D. elliptica</i>	110

Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

A: base nitrogenada adenina

ANOVA: análise de variância

ATV: solução de tripsina 0,2% e Versene 0,02%

C -: controle negativo

C +: controle positivo

C: base nitrogenada citosina

CA: conformação circular aberta do DNA

CCD: cromatografia em camada delgada

CD: carvão-dextrana

CETESB: Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental

cm²: centímetros quadrados

CO₂: dióxido de carbono, gás carbônico

Cu⁺: íons cuprosos

Cu²⁺: íons cúpricos

DMSO: dimetilsulfóxido

DNA: ácido desoxirribonucléico

EDTA: ácido etilenodiaminatetracético

ER : receptores de estrógenos

EREs: elementos de resposta a estrógenos

Er α : receptores de estrógenos α

Er β : receptores de estrógenos β

E2: 17- β -estradiol

$F^{\cdot -}$: semiquinona

F^- : flavonol deprotonado

F' : quinona

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

FEF: fração enriquecida em flavonóides

G: base nitrogenada guanina

g: grama

H^+ : próton

H_2O_2 : peróxido de hidrogênio

HPLC-PAD: cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de arranjo de fotodiodos

IGF: fator de crescimento semelhante a insulina

kg: quilograma

L: conformação linear do DNA

LB: meio de cultura Luria Broth

ln: logaritmo natural

mg: miligrama

mL: mililitro

M: molar

mM: milimolar

$M \pm SD$: média $\pm$ desvio padrão

MTT: brometo de 3- (4,5-dimetitiazol-2-il)-2,5-difenil-2H-tetrazólio

m/v: massa por volume

N: normal

ng: nanograma

nm: nanômetro

nM: nanomolar

NPD: 4-nitrofenilenodiamina

O₂: oxigênio

O₂^{-·}: radical superóxido

OH[·]: radical hidroxila

P.A.: para análise

PBS: solução salina tamponada com fosfato

PE: efeito proliferativo

RM: razão de mutagenicidade

RMN: ressonância magnética nuclear

rpm: rotações por minuto

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

SERMs: moduladores seletivos dos receptores de estrógenos

SFB-CD: soro fetal bovino sem estrógenos

SH: conformação superhelicoidizada do DNA

SPE: extração em fase sólida

T: base nitrogenada timina

Tampão TBE: tampão tris-borato-EDTA

TFA: ácido trifluoracético

UNESP: Universidade Estadual Paulista

UV: ultravioleta

V/cm: *Volts*/centímetro

v/v: volume por volume

°C: graus Celsius

%: percentagem

- S9: ausência de ativação metabólica

+ S9: presença de ativação metabólica

µg: micrograma

µL: microlitro

µm: micrômetro

µM: micromolar

1. Introdução

*“A natureza é o único livro que oferece um conteúdo
valioso em todas as suas folhas”.*

Johann Wolfgang Von Goethe

Muitas pesquisas têm sido baseadas em plantas, que proporcionam aos seres humanos usos diversificados. A planta em si ou seus metabólitos servem a população de muitos modos, um deles é como medicamento. O uso de plantas com fins terapêuticos começou há muito tempo atrás, provavelmente, no primeiro momento em que um indivíduo adoeceu (Sofowora, 1982).

Nos países em desenvolvimento, uma parte substancial da população usa medicamentos de origem vegetal nos seus cuidados à saúde. Algumas das práticas mais comuns envolvem o uso de extratos de plantas, que contêm uma ampla diversidade de moléculas, geralmente, com efeitos biológicos desconhecidos (Konan et al., 2007). Nas últimas décadas, muitos estudos foram direcionados à medicina popular, com o objetivo de identificar produtos naturais com propriedades terapêuticas (Hamburger e Hostetmann, 1991, Weisburger et al., 1996, Silva et al., 1997, Bae et al., 2002).

Nesse contexto, tais produtos têm sido bastante utilizados por mulheres no tratamento dos sintomas da menopausa (Geller e Kronenberg, 2003), que incluem calores súbitos, ansiedade, variações de humor, assim como aumento do risco de muitos problemas de saúde, tais como redução da densidade óssea, doenças cardiovasculares e osteoporose (Harlow e Signorello, 2000).

Esses problemas são amplamente atribuídos à deficiência de hormônios ovarianos, especialmente estrógenos (figura 1), em mulheres na menopausa (Harlow and Signorello, 2000). Estrógenos desempenham papel importante no crescimento, diferenciação e função de muitos alvos, incluindo os sistemas reprodutor feminino e masculino. Eles também apresentam uma variedade de funções farmacológicas, como manutenção da massa óssea, proteção cardiovascular e proteção cerebral (Rymer et al., 2003).

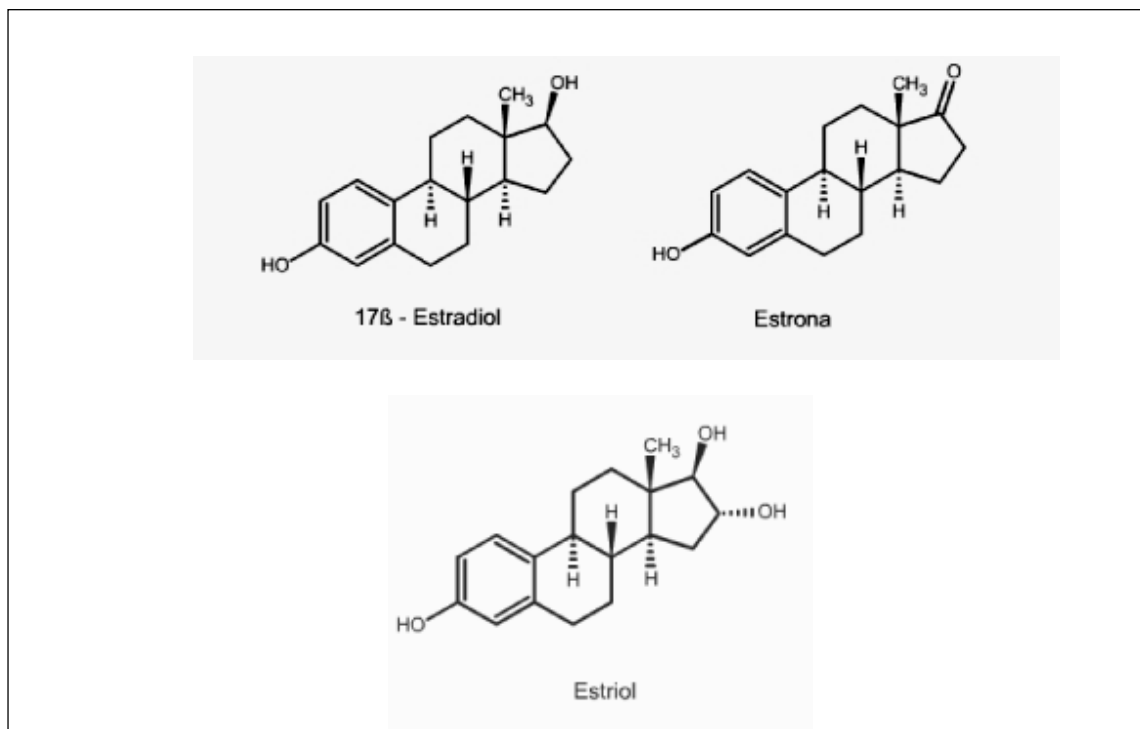


Figura 1: Estrutura química dos principais estrógenos esteroidais. Retirada de Reis Filho et al. (2006).

É bem estabelecido que os níveis de estrógenos modulam a expressão de vários genes. Classicamente, os receptores de estrógenos (ER) foram classificados como fatores de transcrição que modulam a expressão gênica dependendo de interação com ligante. Dois ERs nucleares, receptor de estrógeno alpha ($ER\alpha$) e receptor de estrógeno beta ($ER\beta$), que são expressos distintamente em diferentes tecidos, já foram clonados (Kuiper et al., 1996, 1997, Nilsson e Gustafsson, 2000) e apresentam elevada homologia no domínio de ligação ao DNA, mas possuem homologia moderada no domínio de ligação ao ligante e apenas homologia parcial nas caudas C e N-terminal (Gustafsson, 1999).

Quando os $ER\alpha$ e/ou $ER\beta$ ligam-se ao estradiol, os receptores formam dímeros. Esses dímeros, então, ligam-se a elementos de resposta a estrógenos (EREs) no DNA e

recrutam outros componentes da maquinaria de transcrição, que levam à expressão gênica (Klinge, 2000) (figura 2).

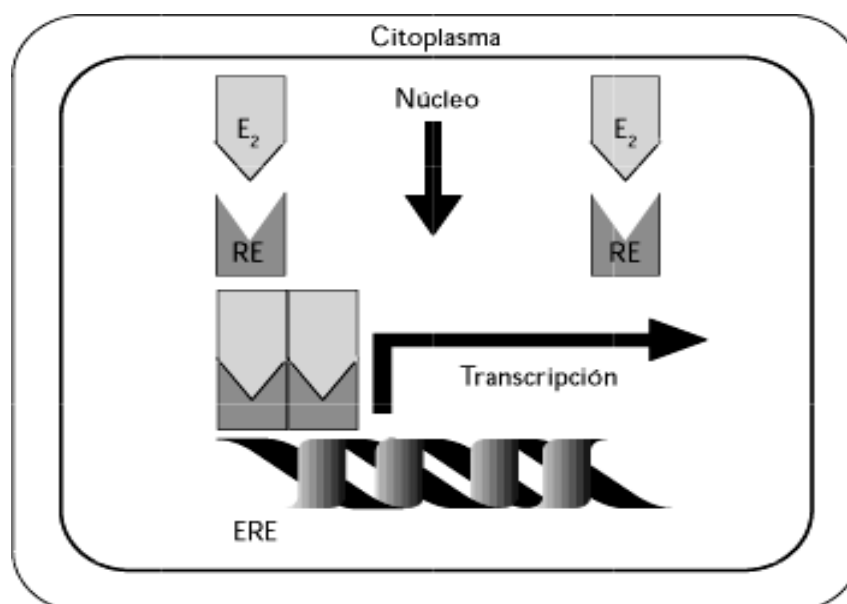


Figura 2: Modelo do mecanismo de ação dos estrógenos. E_2 : estradiol. RE: receptor de estrógenos. ERE: elemento de resposta a estrógenos. Retirada de Barrón-González et al. (2001).

Como consequência, além dos estrógenos exercerem influência determinante no sistema reprodutor, ainda agem sobre o sistema nervoso central, atuam sobre o tecido ósseo, promovendo a deposição de cálcio, alteram a composição da parede vascular, levando a redução da permeabilidade, ativam a coagulação sanguínea, diminuem os níveis de colesterol plasmático e aumentam os do fígado (Aires et al., 1999).

Terapias de reposição hormonal foram introduzidas para reduzir os sintomas da menopausa há 20 anos (Nichols et al., 1984). Todavia, essa terapia, recentemente, tornou-se alvo de debates porque estudos relacionados ao assunto revelaram aumento do risco de

câncer de mama e de doenças das artérias coronárias em mulheres submetidas a este tratamento (Beral et al., 1999, Timins et al., 2004).

Em vista desses riscos clínicos, esforços extensivos têm sido devotados ao desenvolvimento de diferentes preparações que rendessem os benefícios da terapia hormonal, mas com mínimos riscos e inconveniências (Brzezinski e Debi, 1999). Plantas medicinais são preparações promissoras e levam a menos efeitos adversos (Glazier e Bowman, 2001).

Há um movimento crescente no desenvolvimento de estrógenos não-esteroidais (figura 3) que modulem a função dos receptores de estrógenos. Compostos não-esteroidais que se ligam aos receptores de estrógenos são referidos como moduladores seletivos dos receptores de estrógenos (SERMs) (Wu et al., 2003, Kamatenesi-Mugisha e Oryem-Origa, 2005). Eles ligam-se aos ER e produzem efeito agonista ao efeito estrogênico, em alguns tecidos (por exemplo, tecido ósseo e sistema cardiovascular) e efeito antagonista a este, em outros tecidos (por exemplo, útero e mamas) (Michel et al., 2007).

Os principais fatores que direcionam o desenvolvimento de novos SERMs como agentes terapêuticos, na biologia dos ER, são os seguintes: primeiro, SERMs têm melhor seletividade ao receptor que os ligantes esteroidais, como o estradiol; segundo, eles promovem maior seletividade tecidual que os ligantes esteroidais; e terceiro, eles são mais adaptáveis a modificações estruturais, que podem resultar em aumento da potência e melhores propriedades farmacocinéticas e farmacológicas. A busca por novos moduladores seletivos dos receptores de estrógenos, com propriedades terapêuticas, começa, geralmente, com extratos de produtos naturais que apresentam alguma propriedade terapêutica (Wu et al., 2003, Kamatenesi-Mugisha and Oryem-Origa, 2005).

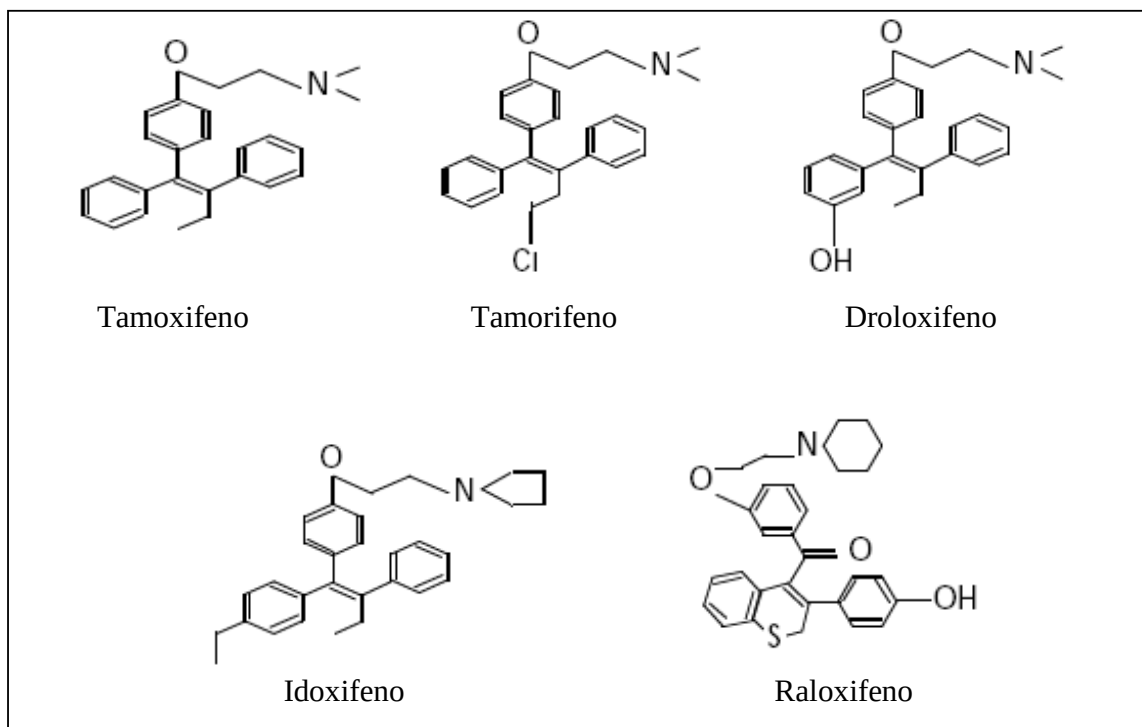


Figura 3: Estrutura química de alguns moduladores seletivos dos receptores de estrógenos. Retirada de Barrón-González et al. (2001).

Fitoestrógenos são compostos não-esteroidais encontrados, naturalmente, em plantas, que contêm estrutura difenólica capaz de exercer atividade estrogênica (Kurzer e Xu, 1997). Vários dos mais potentes fitoestrógenos conhecidos pertencem ao grupo dos isoflavonóides (figura 4), constituintes fitoquímicos encontrados predominante nos grãos de soja. Eles pertencem à classe dos flavonóides, cujos compostos dividem com os estrógenos esteroidais a capacidade de ligar-se aos ER e mediar a transcrição de genes responsivos a estrógenos (Breinholt e Larsen, 1998), e, por isso, vêm sendo fortemente sugeridos como uma alternativa natural à terapia de reposição hormonal (Benassayag et al., 2002, Beck et al., 2005). Dados de Miksicek (1993, 1994) indicam que outros membros da família flavonóide (figura 5), além dos isoflavonóides, exibem propriedades estrogênicas, e são designados flavo-estrógenos.

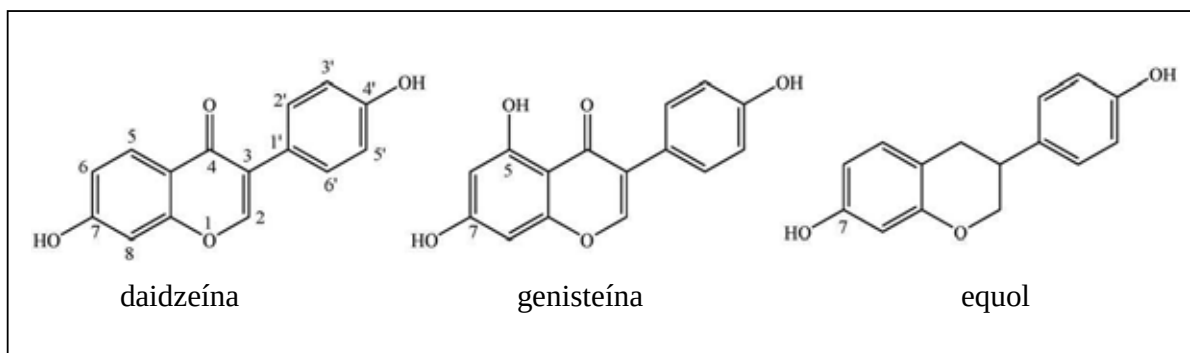


Figura 4: Estrutura química de isoflavonóides. Retirada de Lehmann et al. (2005).

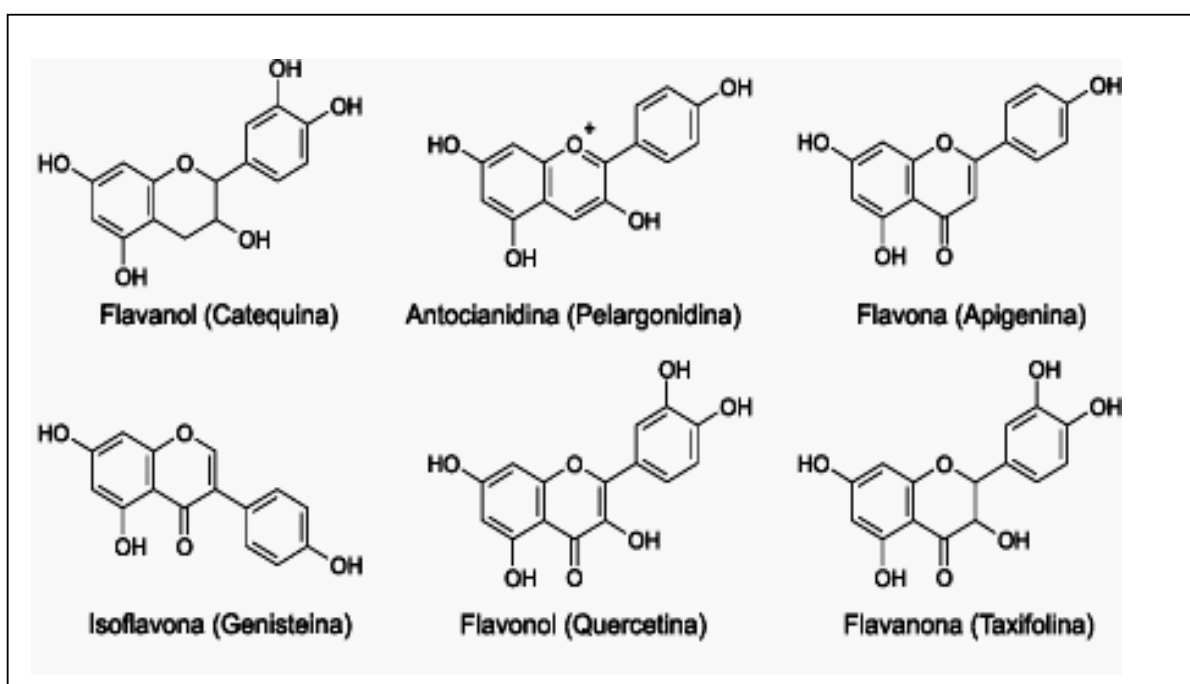


Figura 5: Estrutura química das principais classes de flavonóides. Retirada de Cerqueira et al. (2007).

Diversos ensaios *in vitro* foram desenvolvidos para investigar o potencial estrogênico de um grande número de substâncias, investigando diferentes etapas do

mecanismo de ação proposto para esses hormônios. A maioria desses ensaios está classificada dentro de uma das três categorias: a) ensaios de ligação competitiva ao receptor de estrógenos, que verificam a afinidade de ligação de um composto químico ao receptor estrogênico; b) ensaios de informação gênica, que determinam se a transcrição e tradução gênica são dependentes da interação do receptor de estrógenos com seu ligante; e c) ensaios de proliferação celular, que avaliam o aumento do número de células alvo, durante a fase exponencial de proliferação. Assim, esses ensaios atuam em diferentes níveis de complexidade biológica na resposta celular aos estrogénos (Fang et al., 2000).

Predominantemente baseado em linhagens celulares derivadas de humanos, as técnicas de proliferação utilizam alguns parâmetros para medir a multiplicação celular induzida pela exposição a compostos estrogênicos. Linhagens celulares comumente usadas são as células de câncer de mama humano responsivas a estrógenos, MCF-7 ou T47-D (Zacharewski, 1997). Todavia, para assegurar a confiabilidade da técnica, é necessário garantir que a linhagem celular empregada apresente elevada especificidade de resposta a estrógenos e não prolifere em resposta à ligação a outros receptores, como por exemplo, fatores de crescimento (Jones et al., 1998).

O ensaio E-Screen, desenvolvido por Soto et al. (1992, 1995) com este propósito, é baseado no crescimento das células MCF-7, na presença de estrógenos ou compostos que os mimetizam. Essas células são recomendadas devido a sua reprodutibilidade e sensibilidade estável a esses hormônios. O método pode diferenciar compostos agonistas, agonistas parciais ou inativos (Korach e McLachlan, 1995), comparando a proliferação celular obtida em concentrações variáveis da substância em análise com aquelas observadas após exposição a controles positivos e negativos (Soto et al., 1992; Oh e Chung, 2004).

O teste de proliferação com células MCF-7 (ensaio E-Screen) mostrou ser específico para um número de compostos testados, entre eles, dietilestilbestrol, etinil-estradiol, tamoxifeno, zearalenol, zearalenona e coumestrol, que são sabidamente estrogênicos *in vivo* (Soto et al., 1995), e foi proposto como uma parte dos ensaios de triagem pela Agência de Proteção Ambiental Norte-Americana (Bliley, 1996, Goldman, 1996).

Boué et al. (2003) estudaram a atividade estrogênica de sete extratos de leguminosas, nos quais já havia sido relatada a presença de flavonóides e isoflavonóides. Foram preparados extratos metanólico de soja (*Glycine max* L.), feijão verde (*Phaseolus vulgaris* L.), brotos de alfafa (*Medicago sativa* L.), brotos de feijão-rajado (*Vigna radiata* L.), raízes de kudzu (*Pueraria lobata* L.) e de flores e brotos de trevo violeta (*Trifolium pratense* L.). A atividade estrogênica dos extratos de leguminosas foi analisada pela medida da proliferação das células MCF-7 em resposta a várias concentrações dos extratos (1-100µg/mL), considerando 0% de crescimento com controle de DMSO e 100% de crescimento com controle de 0,1nM de 17β-estradiol. Os extratos das raízes de kudzu, dos brotos de feijão-rajado e alfafa e ambos extratos de trevo violeta promoveram, em pelo menos uma das concentrações testadas, crescimento celular superior ao observado no controle de 0,1nM de 17β-estradiol, sendo que os extratos de trevo violeta induziram crescimento dose-dependente, nas concentrações testadas. O extrato de soja, na maior concentração, evidenciou 90% de proliferação celular, enquanto o extrato de feijão verde mostrou o menor nível de atividade estrogênica, entre os sete extratos de leguminosas testados.

Oh e Chung (2004) avaliaram o potencial do extrato das folhas de *Ginkgo biloba* e seus principais componentes – quercetina, canferol e isorhamnetina – de se ligarem aos

receptores de estrógeno e mediar a resposta estrogênica, através da proliferação de células MCF-7 (ER positivas). 250 µg/mL do extrato de *Ginkgo biloba*, 10^{-4} M de quercetina e 10^{-5} M de canferol e isorhamnetina aumentaram significativamente a proliferação celular, quando comparados ao controle não-exposto a estrógenos.

Além de atuarem como fitoestrógenos, os flavonóides têm capacidade de modular diversas atividades biológicas, entre elas, possuem ação bactericida, comportam-se como agentes antitumorigênicos e desempenham papel importantes na prevenção de doenças cardiovasculares, uma vez que sequestram espécies reativas de oxigênio e influenciam a regulação endógena da biosíntese de colesterol (Havsteen, 2002).

Muitas validações de medicamentos tradicionais têm sido feitas através da pesquisa científica (McGraw et al., 2000, Sparg et al., 2000, Rabe e van Staden, 1998). Além disso, o uso de informações etnofarmacológicas contribui para os cuidados à saúde no mundo todo, através do isolamento de compostos ativos para uso direto na medicina (Fabricant e Farnsworth, 2001). Da Aspirina ao Taxol, indústrias farmacêuticas modernas beneficiam-se amplamente da diversidade de metabólitos secundários dos vegetais para a pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos (Konan et al., 2007).

Investigações sobre o uso tradicional de plantas medicinais são importantes em dois contextos: primeiro, como uma fonte de potenciais fármacos quimioterápicos, e segundo, como medida de segurança para o uso contínuo de plantas medicinais (Veschaeve et al., 2004). Muitos compostos de origem vegetal provaram ter considerável atividade farmacológica, todavia, algumas propriedades indesejáveis, como mutagenicidade, carcinogenicidade e toxicidade, podem restringir seu uso como agentes terapêuticos (Simões et al., 1999).

Inúmeros compostos da classe dos flavonóides são reconhecidos por inibir o desenvolvimento de processos mutagênicos e carcinogênicos. O efeito protetor foi identificado contra mutágenos de ação direta ou indireta e ocorre através de diferentes mecanismos, entre eles, interação direta com metabólitos nucleofílicos e inibição da ativação metabólica de pró-mutágenos (Delaney et al., 2002).

Em contrapartida, alguns flavonóides mostraram ser mutagênicos e genotóxicos, em células procarióticas e eucarióticas (Skibola e Smith, 2000). O mecanismo que descreve essa atividade mutagênica e genotóxica depende da estrutura do flavonóide e, ou de sua metabolização, ou da produção de espécies reativas de oxigênio, por exemplo, radicais superóxido e hidroxila (Duarte Silva et al., 2000).

Levando em consideração que os flavonóides são considerados agentes antioxidantes, parece contraditório que a genotoxicidade de alguns desses compostos seja explicada por ação pró-oxidante. Todavia, é necessário ter em mente que um composto que desempenha atividade antioxidante frente a um lipídeo, pode não exercer a mesma atividade frente a outros alvos celulares, especificamente o DNA. Além disso, para classificar um agente como pró ou antioxidante é importante levar em consideração as condições em que o ensaio é desenvolvido e as doses utilizadas, uma vez que, em baixas concentrações, um composto pode atuar como um antioxidante e, em doses elevadas, desempenhar atividade pró-oxidante, o que parece ser o caso de alguns flavonóides. (Laughton et al., 1989, Halliwell, 1990, Duarte Silva et al., 1996a).

Estudos epidemiológicos em humanos e experimentos em animais mostraram evidências substanciais de que as isoflavonas presentes na soja, bastante empregadas como alternativa natural para terapia de reposição hormonal (Ruggiero e Likis, 2002), têm efeito benéfico sobre neoplasias hormônios-dependentes, por exemplo, câncer de mama e próstata

(Adlercreutz, 2002). Por outro lado, algumas isoflavonas da soja (Munro et al., 2003) e alguns de seus metabólitos (Lehmann et al., 2005) têm sido relatados como portadores de propriedades genotóxicas.

O teste de mutação gênica reversa com *Salmonella* (teste de Ames) tem sido o mais utilizado para identificar mutágenos entre substâncias puras, em misturas e em amostras ambientais. Este teste usa linhagens de bactérias contendo mutações no operon da histidina, o que as deixa incapazes de crescer na ausência deste aminoácido (histidina-dependentes), e também contêm um número de mutações que deixa as células mais sensíveis a xenobióticos mutagênicos (Maron e Ames, 1983). Na presença de mutágenos, uma ou mais dessas linhagens serão mutadas para o tipo selvagem (histidina independente) e serão identificadas pela sua capacidade de crescer e formar colônias na ausência de histidina.

Konan et al. (2007) investigaram a biosegurança do extrato hidroalcoólico das folhas de *Anacardium occidentale* L. (cajuero), planta nativa do Brasil, utilizando, entre outros ensaios, o teste de Ames. O extrato, cuja análise fitoquímica revelou a presença majoritária de taninos e flavonóides, apresentou indícios de mutagenicidade na linhagem TA98, em ausência de ativação metabólica (mistura S9), e na linhagem TA102, em experimento realizado com a mistura S9.

Byrsonima crassa Niedenzu (IK), planta nativa do cerrado brasileiro, é utilizada no tratamento de picadas de cobras, febres, infecções cutâneas e disfunções gástricas (Amarquaye et al., 1994). Cardoso et al. (2006) avaliaram o efeito mutagênico, através de ensaios com *Salmonella typhimurium*, de compostos isolados (quercetina-3-O- β -D-galactopiranosídeo, quercetina-3-O- α -L-arabinopiranosídeo, amentoflavona, galato de metila e (+)-catequina) do extrato metanólico das folhas da planta, forma comumente

utilizada pela população. Amentoflavona induziu mutações na linhagem TA98, em ausência e presença de ativação metabólica.

A mutagenicidade dos flavonóides pode ser atribuída a um processo de auto-oxidação, levando à formação de semiquinonas e quinonas, com concomitante produção de espécies reativas de oxigênio, tais como ânion superóxido e peróxido de hidrogênio. Semiquinonas, quinonas e espécies reativas de oxigênio podem danificar o DNA, promovendo quebra das fitas e modificação dos pares de bases dessa macromolécula (Homma et al., 1994, Toyokuni e Sagripanti, 1996, Duarte-Silva et al., 2000), o que resulta em vários processos biológicos, tais como envelhecimento, mutagênese e carcinogênese (Halliwell et al., 1992, Ames et al., 1993).

Uma das maneiras de avaliar a indução de quebras no DNA por diferentes compostos é através do perfil eletroforético, em gel de agarose, das diferentes conformações de DNA plasmidial – superhelicoidizada, observada no seu estado íntegro, ou circular aberta e linear, induzidas, respectivamente, por quebras em fita única ou na dupla fita do DNA - as quais migram diferencialmente pelo gel de agarose (Yoshino et al., 1999).

Senna (*Cassia angustifolia* Vahl) é uma planta laxativa, cujo extrato apresenta mistura complexa de constituintes ativos, entre eles diantronas glicosiladas, antraquinonas livres e antraquinonas glicosiladas (Sun and Su, 2002). Silva et al. (2008) investigaram o potencial genotóxico do extrato aquoso de Senna, através da indução de quebras nas fitas do DNA, entre outros ensaios. O extrato foi capaz de mediar quebras nas fitas do DNA, de maneira dose-dependente, convertendo a forma superhelicoidizada do DNA nas formas circular aberta e linear, após tratamento com concentrações crescentes da amostra.

Yoshino et al. (1999) avaliaram os danos induzidos no DNA por flavonóides, utilizando o plasmídeo de dupla fita superhelicoidizado pBR322. O plasmídeo foi tratado com quercetina, fisetina, acacetina, crisina, miricetina, galangina, taxifolina e baicaleína, na presença de sulfato de cobre II. Cobre catalisa reações de oxidação dos flavonóides, favorecendo a formação de espécies reativas com o DNA, que podem causar danos nessa macromolécula. As amostras foram incubadas à 37°C, por uma hora e analisadas através de eletroforese em gel de agarose a 0,8%, seguidas por coloração com brometo de etídeo. Tratamento do plasmídeo com miricetina promoveu sua completa degradação em pequenos fragmentos. Quercetina, fisetina, baicaleína e taxifolina induziram quebras em fita única do DNA, levando à formação de DNA plasmidial circular aberto.

Os testes de genotoxicidade/mutagenicidade fornecem uma avaliação do risco humano. Mutagenicidade é definida como uma alteração permanente no conteúdo ou estrutura do material genético de um organismo. Uma mutação pode ser manifestada como uma alteração herdável, em decorrência de mutação em células germinativas, e/ou mutações somáticas, levando a cânceres ou outros processos crônico degenerativos (Dearfield et al., 2002).

O desenvolvimento de cânceres ocorre, muitas vezes, como consequência de mutações sucessivas e expansão do clone mutante. Mutações que inativam genes supressores de tumor, ativam proto-oncogenes e telomerasas, estimulam a proliferação e inibem a morte celular, fornecem um grande estímulo na iniciação de um câncer (Hahn e Weinberg, 2002). Mutações do tipo substituição de bases e deslocamento do quadro de leitura do DNA são encontradas nesses genes, numa grande variedade de tipos de câncer (Greenblatt et al., 1994).

Numerosos estudos têm mostrado que a proporção de carcinógenos identificados como mutágenos varia de aproximadamente 50-90% dependendo da estrutura do composto químico que está sendo testado e dos critérios para sua seleção, e uma resposta positiva em *Salmonella* prediz possibilidade de 77-98% de causar câncer em roedores (Kier et al., 2001, McCann et al., 1975, Mortelmans et al., 1986, Purchase et al., 1978, Sugimura et al., 1976, Zeiger, 1998).

A família Dilleniaceae inclui onze gêneros, entre eles o gênero *Davilla*, que é encontrado na América tropical (Gurni e Kubtzki, 1981, David et al., 1996). *Davilla nitida* Vahl é um arbusto, cujo nome popular é sambaibinha ou lixeirinha de rama, que ocorre, principalmente, na borda de mata ciliar. Levantamento etnofarmacológico indicou o uso popular de *D. nitida* para o tratamento de úlceras gástricas (figura 6). Já *Davilla elliptica* St. Hill é conhecida popularmente como “lixinha”, devido à aspereza de suas folhas. Na medicina popular, o infuso das raízes é utilizado como adstringente tônico e o banho com folhas frescas é indicado em caso de linfatismo, inchações e orquites (figura 7). Estudo fitoquímico de extratos alcoólicos das espécies revelou a presença de ácido gálico, taninos e flavonóides, indicando ainda que, a composição desses últimos nas folhas de *D. nitida* e *D. elliptica* é qualitativamente similar (Rodrigues, 2007). Apesar do uso de *D. nitida* e *D. elliptica* na medicina popular, há poucas informações sobre atividade farmacológica e possíveis efeitos tóxicos dessas plantas.

Davilla nitida Vahl. e *D. elliptica* St. Hil fazem parte da relação de plantas estudadas pelo projeto temático multidisciplinar intitulado *Uso Sustentável da Biodiversidade Brasileira: Prospecção Químico-Farmacológica em Plantas Superiores*, dentro do Programa Biota, financiado pela FAPESP, que busca investigar as espécies vegetais que compõem o Bioma Cerrado e Mata Atlântica do estado de São Paulo,

comparativamente ao Bioma Cerrado do Estado do Tocantins. Para tanto, as pesquisas partem de informações etnobotânicas e etnofarmacológicas e prosseguem com estudos fitoquímicos, farmacológicos e toxicológicos, com o objetivo de detectar e identificar moléculas que tenham eficácia farmacológica e segurança garantidas, para que possam ser utilizadas no desenvolvimento de novos fármacos.



Figura 6: Folhas, frutos e inflorescência de *D. nitida*. Fonte: http://mobot.mobot.org/cgi-bin/search_vast?imagx=10900112, acessada em 23/03/2004.



Figura 7: Folhas e frutos de *D. elliptica*. Fonte: http://mobot.mobot.org/cgi-bin/search_vast?name=Davilla+elliptica, acessada em 23/03/2004.

2. Proposição

*“Quando não conseguir caminhar, use uma bengala. Mas nunca
se detenha”.*

Madre Teresa de Calcutá

A indústria farmacêutica moderna tem obtido amplos benefícios investigando a diversidade de metabólitos secundários vegetais na pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos. Todavia, como alternativas terapêuticas, tais moléculas devem garantir eficácia farmacológica e segurança.

Sendo assim, neste trabalho pretendeu-se avaliar a atividade mutagênica das plantas *Davilla nitida* e *Davilla elliptica*, através da análise de extratos e frações, obtidos a partir das folhas dessas espécies vegetais, além de estudar algumas substâncias isoladas. Dentre essas substâncias, também intencionou-se avaliar a atividade fitoestrogênica dos flavonóides obtidos de *D. elliptica*.

3. Objetivos Específicos

*“O sábio, para ser feliz, olha abaixo de si e jamais acima, a não
ser para elevar sua alma ao infinito”.*

Allan Kardec

Os objetivos do trabalho foram:

1- Avaliar a possível atividade mutagênica das plantas *Davila nitida* e *Davilla elliptica*:

1.1 - testando extratos metanólico e hidroalcoólico de *D. nitida*, extratos metanólico, etanólico e clorofórmico de *D. elliptica*, frações aquosa e acetato de etila do extrato metanólico de *D. nitida* e *D. elliptica*, através de ensaios de mutação gênica reversa com *Salmonella typhimurium* (teste de Ames), utilizando as linhagens TA98, TA97a, TA100 e TA102, em ausência e presença de metabolização;

2.2 - testando frações aquosa e acetato de etila de *D. nitida* e *D. elliptica*, bem como as seguintes substâncias puras isoladas a partir de *D. elliptica*: quercetina, miricetina, quercetina-3-O- α -L-rhamnopiranosídeo (quercetrina), miricetina-3-O- α -L-rhamnopiranosídeo (miricetrina) e ácido gálico, através de ensaios com plasmídio pUC9.1;

2-Avaliar a possível atividade fitoestrogênica dos flavonóides quercetina, miricetina, quercetina-3-O- α -L-rhamnopiranosídeo (quercetrina), miricetina-3-O- α -L-rhamnopiranosídeo (miricetrina), isolados de *D. elliptica*, através de ensaios de proliferação de células MCF-7 (teste E-Screen).

4. Material e Métodos

“A ciência está longe de conhecer o mundo de uma maneira perfeita e adequada; ela tem, no entanto, a pretensão legítima de descobrir, em parte, a natureza e suas leis”.

Jovielt

4.1. Obtenção do material vegetal

Folhas de *Davilla nitida* Vahl. e *D. elliptica* St. Hil (Dilleniaceae) foram coletadas pela prof^a Clélia A. Hiruma-Lima, em março de 2004, em Palmas, Tocantins, Brasil e identificadas pela prof^a Solange de Fátima Lólis. Exsicatas foram depositadas no Herbário da Fundação Universidade do Tocantins com os seguintes números de *voucher*: *D. elliptica* St. Hil (Dilleniaceae) TO4593, *D. nitida* Vahl. (Dilleniaceae) TO3849.

4.2. Obtenção dos extratos, frações e compostos isolados de *Davilla nitida* Vahl. e *D. elliptica* St. Hil

D. nitida e *D. elliptica* fazem parte da relação de plantas do Programa Biota - FAPESP. A análise fitoquímica, o preparo dos extratos, frações e a obtenção das substâncias puras foram realizadas no Laboratório de Fitoquímica, no Departamento de Química Orgânica do Instituto de Química da UNESP, Câmpus Araraquara-SP, pelo Dr. Clenilson Martins Rodrigues, Ms. Daniel Rinaldo e seus colaboradores, sob a coordenação do Prof. Dr. Wagner Vilegas.

4.2.1. Obtenção dos extratos de *Davilla nitida* Vahl. e *D. elliptica* St. Hil e análise fitoquímica

Aproximadamente 1 kg de folhas secas de *D. nitida* foram trituradas e sucessivamente extraídas, por maceração, à temperatura ambiente, com metanol e uma

mistura metanol/água. A evaporação dos solventes foi feita a 60°C, sob pressão reduzida, levando à obtenção dos extratos metanólico (98,2 g) e hidroalcoólico (64,9 g).

Aproximadamente 2 kg de folhas secas de *D. elliptica* foram trituradas e extraídas com clorofórmio e metanol. Os solventes foram evaporados a 60°C, sob pressão reduzida, resultando nos extratos clorofórmico (103,5 g) e metanólico (289,8 g). O extrato etanólico (187,0 g) de *D. elliptica* foi preparado a partir das partes aéreas (1 kg) secas, trituradas e exaustivamente extraídas com etanol a temperatura ambiente, com posterior evaporação do solvente a 60°C, sob pressão reduzida.

A análise do perfil cromatográfico dos extratos metanólico de *D. nitida* e *D. elliptica* foi feita por cromatografia em camada delgada (CCD), em placas de sílica gel, eluídas com misturas de clorofórmio/metanol, de polaridades crescentes, e reveladas com anisaldeído/ácido sulfúrico para indicar a presença de flavonóides. Os extratos metanólicos foram, então, submetidos a uma fase de *clean-up* através de extração em fase sólida (SPE), com cartuchos Sep Pak RP18, que levou à obtenção de eluatos caracterizados por CCD. Os eluatos obtidos na fase de *clean-up* foram analisados, para confirmar as observações obtidas por CCD, num cromatógrafo líquida de alta eficiência Jasco (Tokyo, Japan) acoplado a um detector de arranjo de fotodiodos MD-2010 (HPLC-PAD), equipado com um injetor de amostras Rheodyne (Cotati, CA, USA) 7725 e uma coluna analítica Phenomenex Synergi Hydro RP18 (250 × 4.6 mm i.d.; 4 µm). A fase móvel foi feita com água (eluente A) e acetonitrila (eluente B), ambos contendo 0,05% de ácido trifluoracético (TFA), com taxa de fluxo de 1,0 mL/min.

A identificação dos metabólitos secundários de *D. nitida* e *D. elliptica* foi feita com extratos metanólicos, utilizando os picos eluídos durante as análises por HPLC-PAD. Os compostos foram identificados por comparação dos espectros na região UV, pela

comparação dos tempos de retenção com padrões comerciais e/ou substâncias isoladas de outras espécies vegetais ou ainda por experimentos de co-injeção.

4.2.2. Obtenção das frações do extrato metanólico de *Davilla nitida* Vahl. e *D. elliptica* St. Hil

Os extratos metanólico de *D. nitida* e *D. elliptica* foram fracionados por extração líquido-líquido com uma mistura de acetato de etila e água (1:1, v/v), originando as frações acetato de etila e aquosa. A análise por CCD mostrou que os flavonóides e derivados de ácido gálico estavam concentrados na fração acetato de etila, enquanto os taninos e açúcares livres permaneceram na fração aquosa.

4.2.3. Obtenção dos compostos isolados obtidos a partir de *D. elliptica* St. Hil

Foi preparada uma infusão com 100 g de folhas secas trituradas de *D. elliptica* em um litro de água fervente, por 10 minutos. A mistura foi filtrada para remover macropartículas, resfriada a temperatura ambiente e submetida a uma extração líquido-líquido com uma mistura de acetato de etila e água (1:1, v/v), originando as frações acetato de etila e aquosa. A análise por CCD mostrou que os flavonóides e derivados de ácido gálico estavam concentrados na fração acetato de etila, enquanto os taninos e açúcares livres permaneceram na fração aquosa. A fração acetato de etila foi evaporada a vácuo, até secagem, fornecendo uma massa sólida marron (4 g). O resíduo marron obtido da extração líquido-líquido foi submetido a uma extração em fase sólida, com coluna Sep-Pak RP18,

que permitiu a remoção de co-extrativos, como taninos, açúcares livres e material lipídico, levando à obtenção de uma fração enriquecida em flavonóides (FEF, 3,5 g).

A FEF foi separada utilizando um sistema de HPLC Varian (Walnut Creek, CA, USA) ProStar 210/330 equipado com uma coluna preparativa Dynamax RP18 (250 x 41.4 mm d.i.; 8 μ M) e um injetor de amostra Rheodyne 7125. A fase móvel foi feita com água (eluente A) e metanol (eluente B), ambos contendo 0,05% de TFA, com taxa de fluxo de 15mL/min e detecção a 254 nm. Tal procedimento permitiu o isolamento dos compostos ácido gálico, quercetina, quercetina-3-O- α -L-rhamnopiranosídeo (quercetrina), miricetina e miricetina-3-O- α -L-rhamnopiranosídeo (miricetrina), os quais foram identificados pelos espectros de ressonância magnética nuclear (RMN), comparados com os espectros fornecidos pela literatura.

4.3. Reagentes

Dimetilsulfóxido (DMSO), sal sódico de nicotinamida dinucleotídeo fosfato, sal dissódico de D-glicose-6-fosfato, L-histidina, D-biotina, sal sódico de ampicilina, sulfato de canamicina, tris-hidroximetilaminometano, carvão ativado, dextrana T-70 e sulforodamina B foram obtidos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

Mutágenos padrões: 4-nitrofenilenodiamina (NPD), mitomicina, azida sódica, 2-aminofluorene e 2-antramine também foram obtidos da Sigma. Cloreto de estanho biidratado foi obtido da J. T. Baker (Mallinckrodt Baker Inc., Mexico).

Caldo Nutriente Oxoid No. 2 (Oxoid, Inglaterra), Bacto Ágar, Bacto Triptona e Bacto Extrato de Levedura (Difco, USA) foram usados para preparação dos meios de crescimento bacteriano.

Meio de cultura RPMI 1640, meio de cultura RPMI 1640 sem vermelho de fenol e 17- β -estradiol, obtidos da Sigma, além de soro fetal bovino, obtido da GIBCO (GIBCO, Life Technology) e solução ATV (solução de tripsina 0,2% e Versene 0,02%), obtida do Instituto Adolfo Lutz, foram utilizados nos ensaios de proliferação celular.

Solução de brometo de etídeo 10mg/mL foi obtida da Promega (Promega Corporation, USA).

Ácido tricloroacético foi obtido da J. T. Baker (Mallinckrodt Baker Inc., México)

Todos os outros reagentes utilizados para preparar soluções e meios foram obtidos da Merck (Whitehouse Station, NJ) e da Sigma.

A fração S9 foi obtida da MOLTOX (Molecular Toxicology, Inc., USA).

4.4. Teste de Ames

4.4.1. Linhagens utilizadas

Foram utilizadas as linhagens TA98, TA97a, TA100 e TA102 de *Salmonella typhimurium*, gentilmente cedidas pelo Dr. Bruce Ames da Universidade de Berkeley, Califórnia, USA. A cepa TA98 apresenta mutação no gene *hisD* (*hisD3052*) que codifica para a histidinol desidrogenase, apresentando como ponto preferencial para a reversão oito resíduos repetitivos de GC e detecta compostos mutagênicos que causam deslocamento do quadro de leitura do DNA (*frameshift*). A mutação *hisG46* presente na cepa TA100 ocorre no gene que codifica a primeira enzima do processo de biossíntese da histidina, através da substituição do códon selvagem GGG (CCC) – prolina – por GAG (CAT) – leucina. Assim, essa cepa detecta agentes mutagênicos que ocasionam substituições, principalmente neste

par G-C. A cepa TA102 contém a mutação *ochre* TAA no gene *hisG* e detecta eficientemente mutágenos como formaldeído, glioxal, vários hidroperóxidos, bleomicina, fenilidrazina, raios-X, luz UV, estreptonigrina e agentes *cross-link*, com mitomicina C. A cepa TA97a também detecta mutágenos do tipo *frameshift* e apresenta mutação no gene *hisD 6610* e são alvos para mutação os resíduos GC (Maron e Ames, 1983).

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

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

4.4.3. Preparo dos inóculos de *S. typhimurium* utilizados no ensaio

Com auxílio de alça de inoculação, pequena quantidade da cultura estoque congelada foi semeada em 30mL de caldo nutriente (Oxoid nº 2), incubada a 37 °C, por 12-16 horas, em banho-maria (37°C) com agitação (160 rpm), de modo a obter uma densidade de $1-2 \times 10^9$ bactérias/mL.

4.4.4. Meios de cultura

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

O crescimento das linhagens de *S. typhimurium* foi realizado em caldo nutriente Oxoid nº 2 e o ágar nutriente elaborado à partir do caldo nutriente, sem ampicilina, solidificado com 1,5% de ágar.

Nos ensaios de mutagenicidade, foram usados ágar mínimo glicosado (AMG), constituído de ágar glicose (20 g de glicose, 15 g de Bacto ágar e 930 mL de água destilada) e Meio Vogel Bonner “E” 50x concentrado (10 g de sulfato de magnésio heptahidratado, 100 g de ácido cítrico, 175 g de fosfato de sódio e amônio , 500g de fosfato de potássio dibásico e 670 mL de água destilada) na proporção de 980 mL para 20 mL respectivamente.

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

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

4.4.5. Preparo da mistura de S9

Foi utilizada a fração microsomal S9 homogeneizada de fígado de rato (fração pós-mitocondrial, suplementada com um cofator, preparada a partir de fígado de roedores tratados com agentes indutores de enzimas, aroclor 1254). A fração S9 revela se a substância ou amostra é mutagênica em sua forma original ou necessita ser metabolizada ou

ativada para se tornar mutagênica. Para o preparo da mistura S9, soluções de cloreto de magnésio 0,4M, cloreto de potássio 0,4M, glicose-6-fosfato 1M, β -nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato 0,1M, além de tampão fosfato 0,2M pH 7,4 e água destilada foram adicionados à fração S9 hidratada. Essa mistura foi mantida em banho de gelo durante todo o ensaio. Todas as soluções foram preparadas sempre a fresco e utilizadas num período máximo de 3 horas.

4.4.6. Controles

O controle negativo foi feito com DMSO, o solvente dos extratos e frações. O ensaio foi realizado incluindo-se também controles positivos para confirmar as propriedades de reversão e especificidade de cada cepa. Foram utilizados como controle positivo, em ensaios sem ativação metabólica, o 4-nitrofenilenodiamina (NPD) para as linhagens TA98 e TA97a, azida sódica para a linhagem TA100 e mitomicina para a linhagem TA102; em ensaios com ativação metabólica, foram usados 2-antramino para as linhagens TA98, TA97a e TA100 e 2-aminofluoreno para a linhagem TA102.

4.4.7. Ensaio de mutagenicidade

De acordo com a metodologia de pré-incubação, desenvolvida por Maron e Ames (1983), diferentes concentrações de extratos e frações de *D. nitida* e *D. elliptica*, dissolvidos em DMSO, foram misturadas a 0,1mL de cultura de bactérias e 0,5mL de tampão fosfato pH 7,4 ou 0,5mL de mistura S9, em ensaios na ausência e presença de ativação metabólica, respectivamente, e incubadas por 20-30 minutos a 37° C. Após esse tempo, adicionou-se

2mL de ágar de superfície (“top agar”) suplementado com traços de histidina e biotina, homogeneizou-se levemente e plaqueou-se em meio mínimo glicosado. Após solidificação do “top agar”, as placas foram incubadas por 48 horas, a 37 °C. Após esse período, foi realizada a contagem do número de colônias revertentes por placa. O ensaio foi realizado em triplicata. Foram testadas cinco concentrações que foram determinadas em estudos de triagem, empregando-se a linhagem TA98 ou TA100. A toxicidade das amostras foi verificada através do exame da presença de crescimento de fundo (“background”) nas placas teste de ágar mínimo e pela diminuição do número de revertentes por placa em relação ao controle negativo.

4.4.8. Análise dos resultados

Os dados de mutagenicidade dos extratos e frações de *D. nitida* e *D. elliptica* foram analisados utilizando o programa estatístico Salanal elaborado e gentilmente cedido pelo Dr. L. Myers do Research Triangle Institute, RTP, Carolina do Norte, USA, por intermédio da Dra. Maria Ines Sato (CETESB). Esse programa permite avaliar o efeito dose-resposta através do cálculo da análise de variância (ANOVA – teste F) entre as médias do número de revertentes nas diferentes doses testadas e o controle negativo, seguido de uma regressão linear. A partir dos resultados obtidos, foi calculada a razão de mutagenicidade (RM) para cada dose analisada, que é a média do número de revertentes na placa teste (espontâneos mais induzidos) dividida pela média do número de revertentes do controle negativo. A amostra foi considerada positiva quando a razão de mutagenicidade (RM) foi maior ou igual a dois em pelo menos uma das doses testadas e quando houve uma relação dose resposta entre as concentrações testadas e o número de revertentes induzidos. Por sua vez, a

amostra foi considerada negativa para o teste de Ames, quando a mesma não induziu aumento significativo no número de revertentes e seus RM foram todos menores que dois. Quando somente um dos critérios foi atingido, considerou-se que a amostra apresentou indícios de mutagenicidade (Mortelmans e Zeiger, 2000).

4.5. Ensaaios com plasmídeo pUC9.1

4.5.1 Linhagem bacteriana e plasmídeo

Escherichia coli DH5 α F'IQ foi utilizada como hospedeira do plasmídeo pUC9.1 e foi gentilmente cedida pelo Prof^o. Dr. José Carlos Pelielo de Mattos, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Brasil. A linhagem bacteriana utilizada apresenta genótipo deficiente no gene *rec* e tem gene de resistência a canamicina (Guedes et al., 2006). O DNA plasmidial pUC9.1, de 2695 pares de bases, apresenta resistência genética a ampicilina (Sambrook et al., 1989).

4.5.2. Preparo dos inóculos de *Escherichia coli*

Com auxílio de alça de inoculação, pequena quantidade da cultura estoque congelada foi semeada, por esgotamento, em meio de cultura Luria Broth (meio LB) sólido, com ampicilina a 50 μ g/mL e canamicina a 10 μ g/mL, e incubada *overnight*, a 37°C, de modo a obter colônias isoladas. Uma dessas colônias foi selecionada e com auxílio de cabo de inoculação foi repicada em meio LB líquido, com a mesma concentração de antibióticos existente no meio sólido, incubada a 37°C, por 16-18 horas, com agitação (160 rpm), a fim de obter culturas na fase estacionária de crescimento.

4.5.3. Soluções e meio de cultura

O meio de cultura, bem como as soluções e os tampões necessários para os ensaios com DNA plasmidial pUC9.1 foram preparados de acordo com o especificado por Sambrook et al. (1989).

As soluções de antibióticos foram preparadas, sob condições assépticas, com água destilada esterilizada. Foram utilizadas soluções de ampicilina a 25mg/mL (2,5% sal sódico de ampicilina (m/v) e canamicina a 10mg/mL (1,0% sulfato de canamicina (m/v).

A cultura de *Escherichia coli* DH5 α F'IQ foi feita em meio LB (bacto extrato de levedura 0,45%; bacto triptona 0,9%; cloreto de sódio 0,9%; ágar 1,5% (m/v), com ampicilina a 50 μ g/mL (0,2% (v/v) ampicilina 25mg/mL) e canamicina a 10 μ g/mL (0,1% (v/v) canamicina 10mg/mL).

Tampão de carregamento 6x concentrado (0,25% de xilenocianol FF, 0,25% de azul de bromofenol, 30% de glicerol, em água), gel de agarose 0,8% (0,28g agarose, 35mL TBE), tampão TBE (1 parte de tampão TBE 10x concentrado – 5,5% ácido bórico; 10,8% tris-hidroximetilaminometano; 0,93% EDTA dissódico, em água ultrapura – em 9 partes de água ultrapura) e solução de brometo de etídeo a 2,0 μ g/mL (0,02% brometo de etídeo 10mg/mL; 2,0% tampão TBE 10x concentrado, em água destilada) ou solução de brometo de etídeo 10mg/mL foram utilizados para realizar as corridas eletroforéticas

4.5.4. Preparação plasmidial

DNA plasmidial pUC9.1 foi extraído pelo método de lise alcalina, como descrito por Sambrook et al. (1989), utilizando kit para extração plasmidial da *Fermentas Life Sciences* (#K0503 *GeneJET Plasmid Miniprep Kit*). A quantificação do DNA obtido foi realizada em espectrofotômetro de luz ultravioleta, com leitura em comprimento de onda de

260nm (uma unidade de densidade ótica, em 260nm, corresponde a 50µg/mL DNA). O DNA plasmidial obtido, que não foi utilizado no momento da extração, foi estocado a 4°C, por, no máximo, cinco dias.

4.5.5. Preparo das amostras e eletroforese

Alíquotas (5 µL) do DNA plasmidial obtido foram tratadas com concentrações crescentes das frações acetato de etila (0,5 – 25,0 mg/mL) e aquosa (5,0 – 25,0 mg/mL) de *D. nitida* e *D. elliptica*, como também com concentrações crescentes das substâncias puras (0,2 – 2,0mM) – quercetina (0,06 – 0,6mg/mL), miricetina (0,06 – 0,6mg/mL), quercetina-3-*O*- α -L-rhamnopiranosídeo (quercetrina) (0,09 – 0,9mg/mL), miricetina-3-*O*- α -L-rhamnopiranosídeo (miricetrina) (0,09 – 0,9mg/mL) e ácido gálico (0,03 – 0,3mg/mL) - num volume de reação de 50 µL, completos com DMSO. Em alguns ensaios, o plasmídeo pUC9.1 foi tratado com as amostras, na presença de cobre. Nesses casos, apenas uma concentração de cada amostra foi testada, ou seja, utilizou-se 5mg/mL das frações e 0,2mM das substâncias puras, e adicionou-se solução de sulfato de cobre II, na mesma concentração das amostras – 5 mg/mL no tratamento com as frações (16,6% de solução de sulfato de cobre II 30mg/mL) e 0,2 mM no tratamento com as substâncias puras (20% de solução de sulfato de cobre II 1mM). As reações foram incubadas a 37°C, por 1 hora (Yoshino et al., 1999) e, ao final desse tempo, alíquotas de cada amostra (100 ng) foram misturadas com 2µL de tampão de carregamento e aplicadas em gel de agarose a 0,8%. O gel foi submetido à eletroforese em cuba horizontal, em tampão TBE, com voltagem de 6V/cm, por, aproximadamente, duas horas, até que ocorresse a separação das bandas. O gel foi corado com banho de brometo de etídeo (0,5 µg/mL), examinado e fotografado através de luz ultravioleta, em um sistema de transiluminação. Em algumas situações, o gel foi

excessivamente corado e, nesses casos, solução de brometo de etídeo (10 mg/mL) foi previamente adicionada à suspensão de agarose (35 mL), utilizada para preparo do gel, resultando em uma concentração final de corante no gel de 6µg/mL. As imagens dos géis foram obtidas usando o equipamento *AlphaImager*, da AlphaInotech, gentilmente cedido pelo laboratório de micobacteriologia Prof^o. Dr. Hugo David, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP, sob coordenação da Prof^a. Dr. Clarice Queico Leite.

4.5.6. Controles

O controle negativo foi feito com DMSO, o solvente das frações e substâncias puras. O potencial não genotóxico do DMSO foi verificado comparando-se amostras de DNA tratadas com DMSO e água ultrapura, através de eletroforese em gel de agarose a 0,8%, nas mesmas condições dos ensaios. O controle positivo foi feito com cloreto de estanho, que é capaz de modificar a estrutura conformacional do DNA plasmidial (conformação superhelicoidizada é convertida na conformação circular aberta), como demonstrado por Mattos et al. (2000). Nos casos em que o plasmídeo pUC9.1 foi tratado com as amostras, na presença de cobre, o potencial não genotóxico do cobre foi verificado comparando-se amostras de DNA tratadas com sulfato de cobre e DMSO, através de eletroforese em gel de agarose a 0,8%, nas mesmas condições dos ensaios.

4.5.7. Análise dos géis

No seu estado natural, não danificado, DNA plasmidial existe numa conformação compacta superhelicoidizada, e como tal, tem elevada mobilidade eletroforética. Após a indução de quebras em fita única, a estrutura terciária superhelicoidizada é rompida, resultando em uma conformação circular aberta e mobilidade eletroforética reduzida em

agarose. DNA plasmidial linear, formado por quebras na dupla fita, tem mobilidade intermediária entre as observadas pelas conformações superhelicoidizada e circular aberta de DNA plasmidial (Rahman et al., 1992). Portanto, a análise por eletroforese em gel de agarose fornece informação a respeito dos tipos de quebras das fitas, pela separação das diferentes conformações do DNA plasmidial (Yoshino et al., 1999).

A análise densitométrica de cada conformação do DNA plasmidial foi feita com o auxílio do programa *AlphaEase* FC, da AlphaInotech, também gentilmente cedido pelo laboratório de micobacteriologia Prof^o. Dr. Hugo David, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP, sob coordenação da Prof^a. Dr. Clarice Queico Leite, através da função *SpotDens*, das ferramentas de análises, que verifica a relação entre a quantidade de pixels e a área pré-estabelecida das bandas de cada conformação do DNA – superhelicoidizada, circular aberta e linear - em cada concentração das amostras e nos controles, levando em consideração um padrão de massa de DNA fornecido.

A análise dos dados densitométricos fornece a percentagem de eventos nulos (ausência de quebras), para cada uma das concentrações testadas, com cada amostra. Usando a distribuição de Poisson, foi obtido o valor médio de quebras para cada um dos tratamentos, a partir das percentagens das conformações de DNA superhelicoidizado, como segue: $\mu = -\ln p(0; \mu)$ (Remington e Schor, 1985). A significância estatística do número de quebras por genoma fornecido pela distribuição de Poisson foi verificada por análise de variância (ANOVA – fator único) entre o número médio de quebras por genoma induzido pelas diferentes concentrações, de cada amostra, e o controle negativo, ao nível de 5% de significância ($\alpha = 0,05$). Nos ensaios em que o plasmídeo foi incubado com as amostras, na presença de cobre, a significância estatística do valor médio de quebras foi verificada aplicando-se teste *t* de Student sobre número médio de quebras por genoma induzido pela

única concentração testada, de cada amostra, e o controle negativo, ao nível de 5% de significância ($\alpha = 0,05$). A existência de diferença significativa entre o número de quebras por genoma induzido pelas diferentes amostras foi analisada por ANOVA, seguido por teste de Tukey para comparações múltiplas entre médias.

Nos casos específicos em que o DNA plasmidial foi tratado com as frações acetato de etila de *D. nitida* e *D. elliptica*, foi utilizada regressão linear, com posterior análise estatística do coeficiente angular da reta, através do teste *t* de Student (verifica a nulidade ou não do coeficiente angular da reta), para determinar a existência de relação linear entre as variáveis - concentração das amostras e concentração da forma superhelicoidizada (íntegra) do DNA.

4.6. Ensaio de proliferação com células MCF-7 (teste E-screen)

4.6.1. Meios de cultura e soluções

Os meios de cultura e soluções necessários para os ensaios de proliferação celular foram preparados de acordo com as especificações de Rasmussen e Nielsen (2002).

As células MCF-7 foram cultivadas em meio RPMI 1640 (10,4 g do pó dissolvido em 1000 mL de água ultrapura, acrescido de 2,32 g de hepes e 2,0 g de bicarbonato de sódio), cujo pH foi ajustado a 7,2 a 7,3, com ácido clorídrico 1N (88,2% (v/v) ácido clorídrico em água destilada) ou hidróxido de sódio 1N (4% (m/v) hidróxido de sódio em água destilada), esterilizado em sistema de filtração à vácuo, com membrana de poros de 0,22 μ m de diâmetro (Corning Incorporated, Acton MA, USA) e suplementado com 10% de soro fetal bovino.

Nos repiques, utilizou-se tampão PBS “*Phosphate Buffered Saline*” (0,8% (m/v) de cloreto de sódio, 0,21% (m/v) de fosfato de sódio dibásico heptaidratado, 0,6% (m/v) de dihidrogenofosfato de potássio, em água destilada), esterilizado em autoclave a 121°C por 15 minutos, e solução ATV, diluída 1:2 com PBS.

Durante os ensaios de proliferação, foram usadas solução 1mM de 17-β- estradiol (1 mg em 4 mL de etanol absoluto P.A.), meio RPMI 1640 sem vermelho de fenol, preparado da mesma maneira que o meio RPMI 1640 acima mencionado, suplementado com 10% de soro fetal bovino, tratado com carvão ativado e dextrana T-70, para remoção de estrógenos endógenos.

No ensaio colorimétrico da sulforadamina B, foram usadas solução de ácido tricloroacético (10% (m/v) em água destilada), solução de sulforodamina B (0,4% (m/v) em ácido acético 1%), solução de ácido acético (1% (v/v) em água destilada) e tampão Tris base, 10 mM (0,12% (m/v) em água destilada), pH 10,5, ajustado com ácido clorídrico 1N ou hidróxido de sódio 1N.

4.6.2. Linhagem celular e condições de cultivo das células

As células MCF-7/ATCC de tumor de mama humano (epiteliais, aderentes) foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho, da Universidade Estadual de Campinas, Brasil. As células foram rotineiramente cultivadas em meio RPMI 1640, suplementado com 10% de soro fetal bovino (meio de manutenção), em frascos de cultura de 25 cm² (Corning Incorporated, Acton MA, USA), a 37°C, em atmosfera com 5% de CO₂ e 95% de saturação de umidade (Fornelli et al., 2007), até um máximo de 10 passagens.

As células foram repicadas semanalmente, por tripsinização. Estoques da linhagem celular foram mantidos em nitrogênio líquido, com aproximadamente 2×10^6 células por frasco crioprotetor, em meio RPMI 1640, com 40% de soro fetal bovino e 10% de dimetilsulfóxido (DMSO).

4.6.3. Remoção de estrógenos endógenos através do tratamento do soro fetal bovino com Carvão – Dextrana

Carvão foi lavado duas vezes com água gelada estéril imediatamente antes do uso. Uma suspensão de 5% de carvão e 0,5% de dextrana foi preparada. Alíquotas da suspensão de carvão-dextrana (CD) similar às alíquotas de soro a serem processadas foram centrifugadas a 2500 rpm por dez minutos. Os sobrenadantes foram retirados e as alíquotas de soro foram misturadas ao *pellet* de carvão. Essa mistura de carvão e soro foi mantido sob agitação, a 37°C, por uma hora. A suspensão foi centrifugada a 4600 rpm, duas vezes, por 20 minutos. O sobrenadante foi esterilizado através de membrana filtrante de 0,22µm e, então, aquecido a 65°C, por, aproximadamente, 90 minutos (Soto et al., 1995).

4.6.4. Ensaio de citotoxicidade

Células MCF-7 cultivadas em meio de manutenção, em uma atmosfera de 5% de CO₂ e 95% de umidade do ar, a 37°C, há mais de três passagens, foram lavadas com 5 mL de tampão PBS e tratadas com 0,5 mL de solução ATV, diluída 1:2 com PBS. Os frascos de cultura foram deixados à temperatura ambiente até que as células não estivessem mais aderidas e, então, as células foram ressuspensas em 1,5 mL de meio de manutenção,

contadas em câmara hemocitométrica de Neubauer (Boeco, Germany) e semeadas em placas de 96 cavidades (Corning), a uma concentração inicial de 5×10^4 células/cavidade, em 100 μ L de meio de manutenção. A aderência das células à placa ocorreu durante 24 horas, e após esse tempo, o meio de cultura foi removido e foram adicionados os controles e as amostras, diluídos em 100 μ L de meio de manutenção (Oh e Chung, 2004).

Os flavonóides isolados da planta *D. elliptica* - quercetina, quercetina-3-O- α -L-rhamnopiranosídeo (quercetrina), miricetina, miricetina-3-O- α -L-rhamnopiranosídeo (miricetrina) foram diluídos em DMSO, numa concentração final de 300 mM para as formas agliconas e 200 mM para seus derivados glicosilados.. Eles foram diluídos para as concentrações desejadas (100 e 200 μ M) (quercetina e miricetina – 0,03 e 0,06 mg/mL; quercetrina e miricetrina – 0,05 e 0,1 mg/mL) em meio de manutenção, no momento do uso. A concentração final de solvente no meio de cultura não excedeu 0,1%. DMSO sozinho, em concentrações de até 0,5%, não promove efeitos citotóxicos (Rasmussen e Nielsen, 2002).

O controle positivo dos ensaios foi feito com DMSO 30%, em meio de cultura. O controle negativo foi feito com meio de cultura de manutenção e foi considerado como 100% de viabilidade celular.

A viabilidade celular foi avaliada após 24, 48 e 72 horas, usando o ensaio colorimétrico da sulforodamina B (Skehan et al., 1990, Rasmussen e Nielsen, 2002). Foram consideradas citotóxicas as concentrações das amostras que promoveram viabilidade celular inferior a 80%.

4.6.5. Ensaio E-Screen

Células MCF-7 cultivadas em meio de manutenção, em uma atmosfera de 5% de CO₂ e 95% de umidade do ar, a 37°C, há mais de três passagens, foram lavadas com 5 mL de tampão PBS e tratadas com 0,5 mL de solução ATV, diluída 1:2 com PBS. Os frascos de cultura foram deixados à temperatura ambiente até que as células não estivessem mais aderidas e, então, as células foram ressuspensas em 1,5 mL de meio de manutenção, contadas em câmara hemocitométrica de Neubauer (Boeco, Germany) e semeadas em placas de 96 cavidades (Corning), a uma concentração inicial de 4500 células/cavidade, em 200 µL de meio de manutenção. Após 24 horas, o meio de cultura foi cuidadosamente aspirado, as cavidades foram rapidamente lavadas com 100 µL de meio RPMI 1640 sem vermelho de fenol, suplementado com 10% de soro fetal bovino sem estrógenos (SFB-CD) e, então, as células foram expostas a controle e amostras (quercetina, quercetina-3-O- α -L-rhamnopiranosídeo, miricetina, miricetina-3-O- α -L-rhamnopiranosídeo), nas concentrações desejadas (50 a 0,01 µM) (quercetina e miricetina – 20 a 0,003 µg/mL; quercetrina e miricetrina – 20 a 0,005 µg/mL), diluídas em 200 µL de meio de cultura RPMI 1640 sem vermelho de fenol, completo, livre de estrógenos (meio experimental) (Rasmussen e Nielsen, 2002). As maiores concentrações das amostras testadas no ensaio E-Screen foram determinadas excluindo as concentrações que reduziram a viabilidade celular, nos ensaios de citotoxicidade, e considerando dados da literatura. A concentração final de solvente no meio experimental não excedeu 0,1%. O meio RPMI 1640 sem vermelho de fenol foi utilizado, pois foi demonstrado que esse indicador de pH possui atividade estrogênica (Berthois et al., 1986).

A proliferação celular foi avaliada após sete dias em cultura, usando o ensaio colorimétrico da sulforodamina B (Skehan et al., 1990, Rasmussen e Nielsen, 2002).

4.6.6. Controles e curvas hormonais

Em cada ensaio de proliferação realizado com as amostras, foram incluídos controles espontâneo, negativo e positivo. O controle espontâneo foi feito com meio de manutenção, o controle negativo foi feito com meio experimental e o controle positivo foi feito com 17- β -estradiol (E2) 10^{-5} M.

Além dos ensaios de proliferação com as amostras, também foram realizadas curvas hormonais, nas mesmas condições, utilizando soluções de diferentes concentrações de 17- β -estradiol (10^{-5} a 10^{-9} M), preparadas a partir de uma solução estoque em etanol (1 mM), no momento do uso. A concentração final de etanol no meio de cultura não excedeu 1%; concentração tal que não afeta a proliferação celular (Payne et al., 2000). No preparo de cada curva hormonal, também foram incluídos controles espontâneo e negativo.

4.6.7. Ensaio da Sulforodamina B

O ensaio colorimétrico da sulforodamina B foi desenvolvido de acordo com as especificações de Skehan et al. (1990), seguindo as modificações de Rasmussen e Nielsen (2002).

Nesse ensaio, o meio foi cuidadosamente removido para evitar que as células perdessem aderência às cavidades e, então, as células foram incubadas a 4°C, por 30 minutos, com 200 μ L de ácido tricloroacético 10%. Após incubação, o ácido tricloroacético foi descartado, as cavidades foram delicadamente lavadas, por cinco vezes, com água corrente e completamente secas ao ar. As células fixadas com ácido tricloroacético, após

secagem, foram coradas com 100 µL de sulforodamina B 0,4%, incubadas por dez minutos, sob agitação. A seguir, o sobrenadante foi desprezado e o corante que não se ligou às células foi removido através de cinco lavagens consecutivas dos orifícios com ácido acético 1%. Após secagem completa, o corante que se ligou às células foi solubilizado com 200 µL de tampão tris base 10 mM, pH 10,5, por 20 minutos, sob agitação, e a intensidade do corante foi lida a 490 nm em um leitor de microplacas TECAN (TECAN AUTRIA GMBH – AUSTRIA), que foi gentilmente cedido pelo laboratório de micobacteriologia Prof^o. Dr. Hugo David, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP, sob coordenação da Prof^a. Dr. Clarice Queico Leite.

4.6.8. Análise estatística

O objetivo básico do ensaio E-Screen é a determinação do número de células relativo a um controle livre de hormônios. O efeito proliferativo é calculado como a razão entre o número de células obtido com 17-β-estradiol, ou com os compostos teste, e o número de células no controle negativo:

$$PE = \text{número células (composto)} / \text{número células (controle negativo)}$$

Para estabelecer relações dose-resposta, pelo menos três experimentos independentes foram realizados e, dentro de cada experimento, seis replicatas por concentração foram utilizadas para estabelecer valores médios. O número de células em cada experimento foi normalizado no controle negativo, para corrigir diferenças na densidade celular semeada inicialmente. A significância estatística dos dados obtidos nos diversos grupos de tratamentos, em relação aos controles, foi determinada por análise de variância (ANOVA – fator único), ao nível de 5% de confiança ($\alpha = 0,05$).

5. Resultados

“Tentar e falhar é, pelo menos, aprender. Não chegar a tentar é sofrer a inestimável perda do que poderia ter sido”.

5.1. Teste de Ames

Os resultados da avaliação da mutagenicidade dos extratos e frações de *D. nitida* e *D. elliptica*, realizada através do ensaio de mutação gênica reversa com *Salmonella typhimurium* (teste de Ames), estão apresentados nas tabelas 1 a 4.

5.1.1. Teste de Ames com extratos e frações de *D. nitida*

A tabela 1 mostra o número de revertentes obtido para cada linhagem de *S. typhimurium*, bem como as razões de mutagenicidade, em experimentos realizados com os extratos metanólico e hidroalcoólico de *D. nitida*.

Para o extrato metanólico, em ensaios em ausência de metabolização (- S9), verificou-se que, para as linhagens TA98 e TA97a, a mutagenicidade foi positiva, pois o efeito dose-resposta foi significativo ($p < 0,01$) e a razão de mutagenicidade foi ≥ 2 em pelo menos uma das doses avaliadas. Para a TA100 e TA102 a atividade mutagênica foi negativa. Em presença de metabolização (+ S9), o extrato metanólico induziu mutagenicidade na linhagem TA98. Portanto, o extrato metanólico induziu predominantemente mutações do tipo *frameshift*, revelando a presença de compostos mutagênicos tanto de ação direta, os quais induzem mutações antes de serem metabolizados, quanto de ação indireta, que necessitam ser ativados para que seus metabólitos promovam mutações. Foram observados indícios de toxicidade para as linhagens TA97a e TA 100.

Para o extrato hidroalcoólico, em experimentos sem ativação metabólica, a mutagenicidade foi negativa para todas as linhagens testadas. Com ativação metabólica, a

mutagenicidade foi positiva para a linhagem TA98 e negativa para as demais. Assim, denota-se que no extrato hidroalcoólico de *D. nitida* existem compostos capazes de induzir mutações do tipo *frameshift* e que necessitam ser metabolizados para exercer essa atividade. Foram observados sinais de toxicidade para as linhagens TA97a e TA100 nas maiores concentrações.

Na tabela 2 estão apresentados os resultados da avaliação da mutagenicidade das frações aquosa e acetato de etila de *D. nitida*.

A fração aquosa evidenciou apenas indícios de mutagenicidade na linhagem TA97a, em ausência e presença de metabolização.

Já a fração acetato de etila apresentou, em experimentos sem ativação metabólica, atividade mutagênica positiva para a linhagem TA98. Foram observados indícios de toxicidade na linhagem TA102, na maior concentração testada. Em experimentos com metabolização, essa fração induziu mutagenicidade nas linhagens TA98 e TA97a. Ainda em ensaios realizados com S9, a fração acetato de etila mostrou indícios de mutagenicidade, na linhagem TA100, uma vez que apresentou efeito dose-resposta positivo ($p < 0,05$) e razão de mutagenicidade maior que 1,5, mas menor que dois ($1,5 \leq RM \leq 2,0$), em pelo uma das doses avaliadas. De acordo com esses resultados, pode-se sugerir que os compostos responsáveis pela mutagenicidade induzida pelo extrato metanólico estão presentes na fração acetato de etila.

Tabela 1

Atividade mutagênica dos extratos da planta *Davilla nitida* nas linhagens TA98, TA97a, TA100 e TA102 de *Salmonella typhimurium*, em ausência e presença de ativação metabólica (S9).

Tratamento		Número de revertentes/placa (RM) em linhagens de <i>S.typhimurium</i> (M±SD)							
(mg/placa)		TA98		TA97a		TA100		TA102	
<i>D. nitida</i>		-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9
MeOH									
0,00 ^a		27±5	22±3	174±15	143±8	194±40	138±8	337±7	352±6
0,94		26±2(1,0)	52±5(2,4)**	211±16(1,2)	135±38(0,9)	176±6(0,9)	120±4(0,9)	371±23(1,1)	352±55(1,0)
1,88		29±6(1,1)	59±5(2,7)**	207±8(1,2)	153±31(1,1)	158±24(0,8)	122±10(0,9)	332±25(1,0)	368±69(1,0)
3,75		32±3(1,2)	55±18(2,5)*	255±2(1,5)**	152±74(1,1)	171±3(0,9)	101±23(0,7)	384±37(1,1)	279±27(0,8)
7,50		54±2(2,0)**	55±9(2,5)*	304±23(1,8)**	107±1(0,7)	174±18(0,9)	93±20(0,7)	336±29(1,0)	271±51(0,8)
11,25		41±10(1,5)	38±14(1,7)	351±15(2,0)**	67±23(0,5)	208±13(1,1)	88±8(0,6)	321±9(1,0)	223±10(0,6)
C ^b		1009±107	381±34	810±40	813±10	1319±77	835±21	1847±47	1688±36
MeOH/H₂O									
0,00 ^a		41±6	22±3	174±15	143±8	113±15	138±8	337±7	352±6
0,65		33±7(0,8)	40±1(1,8)*	144±12(0,8)	121±22(0,8)	143±8(1,3)	133±20(1,0)	326±47(1,0)	352±31(1,0)
1,30		26±5(0,6)	45±6(2,0)*	136±10(0,8)	134±3(0,9)	107±12(1,0)	115±13(0,8)	346±37(1,0)	248±43(0,7)
2,60		27±5(0,7)	44±8(2,0)*	153±11(0,9)	125±18(0,9)	130±13(1,2)	86±9(0,6)	317±6(0,9)	235±33(0,7)
5,20		41±6(1,0)	33±0(1,5)	172±16(1,0)	67±4(0,5)	133±5(1,2)	65±9(0,5)	368±7(1,1)	227±45(0,6)
7,80		27±2(0,7)	35±0(1,6)	223±22(1,3)	41±16(0,3)	149±8(1,3)	69±16(0,5)	384±48(1,1)	218±29(0,6)
C ^b		334±32	381±34	810±40	813±10	1369±84	835±21	1847±47	1688±36

* P<0,05 (ANOVA); ** P<0,01 (ANOVA), M±SD= média ± desvio padrão ^a Controle negativo: dimetilsulfóxido, 75µl/placa.

^b Controles positivos: 4-nitrofenilenodiamina, 10µg/placa (TA98 e TA97a); azida sódica, 2,5µg/placa (TA100); mitomicina 3,0µg/placa (TA102), em ausência de S9 e 2-antramina 0,125 µg/placa (TA98, TA97a e TA100); 2-aminofluoreno, 10µg/placa (TA102), em presença de S9.

Tabela 2

Atividade mutagênica das frações aquosa e acetato de etila do extrato metanólico da planta *Davilla nitida* nas linhagens TA98, TA97a, TA100 e TA102 de *Salmonella typhimurium*, em ausência e presença de ativação metabólica (S9).

Tratamento		Número de revertentes/placa (RM) em linhagens de <i>S.typhimurium</i> (M±SD)							
(mg/placa)		TA98		TA97a		TA100		TA102	
<i>D. nitida</i>		-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9
Aquosa									
0,00 ^a		25±5	18±2	107±9	147±17	137±6	125±9	285±4	259±13
7,00		26±3(1,0)	17±4(0,9)	199±15(1,9)**	261±14(1,8)**	130±3(1,0)	107±6(0,9)	329±1(1,2)	371±25(1,4)
14,00		17±1(0,7)	17±5(0,9)	181±15(1,7)**	180±25(1,2)	139±3(1,0)	98±9(0,8)	289±9(1,0)	224±9(0,9)
28,00		22±0,7(0,9)	13±2(0,7)	156±13(1,5)*	188±26(1,3)	107±4(0,8)	87±7(0,7)	378±11(1,3)	238±43(0,9)
56,00		23± 3(0,9)	10±3(0,6)	167±26(1,6)*	121±22(0,8)	143±4(1,0)	57±12(0,5)	259±13(0,9)	170±19(0,7)
84,00		26±3(1,0)	13±5(0,7)	194±21(1,8)**	128± 6(0,9)	136±8(1,0)	64±7(0,5)	260±11(0,9)	200±30(0,8)
C ^b		2630±112	2227±78	683±20	1250±269	1836±28	1638±547	667±10	1354±41
Acetato de etila									
0,00 ^a		28±5	18±2	107±9	147±17	147±6	93±13	275±3	259±13
0,14								236±20 (0,9)	
0,28								248±20 (0,9)	
0,56								231±4 (0,8)	
1,12		43±12 (1,5)	43±2 (2,4)**	139±65 (1,3)	385±37 (2,6)**	156±19 (1,1)	156±14 (1,7)*	249±10 (0,9)	371±25 (1,4)
2,24		50±7 (1,8)*	54±4 (3,0)**	132±11 (1,2)	330±66 (2,2)*	161±7 (1,1)	155±9 (1,7)**	174±30 (0,6)	224±9 (0,9)
4,48		55±1 (2,0)**	62±4 (3,4)**	137±9 (1,3)	308±101 (2,1)*	132±19 (0,9)	122±12 (1,3)		238±43 (0,9)
8,96		72±4 (2,6)**	58±7 (3,2)**	113±11 (1,1)	270±87 (1,8)	142±12 (1,0)	96±18 (1,0)		170±19 (0,7)
13,43		71±2 (2,5)**	59±6 (3,3)**	96±2 (0,9)	180±49 (1,2)	129±10 (0,9)	83±1 (0,9)		200±30 (0,8)
C ^b		2717±170	2227±78	638±20	1250±269	1306±66	1638±547	939±117	1354±41

* P<0,05 (ANOVA); ** P<0,01 (ANOVA). M±SD= média ± desvio padrão. ^a Controle negativo: dimetilsulfóxido, 75µl/placa.

^b Controles positivos: 4-nitrofenilenodiamina, 10µg/placa (TA98 e TA97a); azida sódica, 2,5µg/placa (TA100); mitomicina 3,0µg/placa (TA102), em ausência de S9, e 2-antramino 0,125 µg/placa (TA98, TA97a e TA100); 2-aminofluoreno, 10µg/placa (TA102), em presença de S9.

5.1.2. Teste de Ames com extratos e frações de *D. elliptica*

Da espécie *D. elliptica*, foram avaliados os extratos metanólico, etanólico e clorofórmico. A Tabela 3 mostra os resultados obtidos através do número de mutantes revertentes e as razões de mutagenicidade. Em ausência de metabolização, os extratos etanólico e clorofórmico mostraram apenas indícios de mutagenicidade na linhagem TA97a. Sinais de toxicidade foram observados na linhagem TA102, nas maiores concentrações testadas. Em presença de metabolização, os extratos metanólico, etanólico e clorofórmico apresentaram atividade mutagênica positiva na linhagem TA98, indicando a presença de compostos indutores de mutações do tipo *frameshift*, que agem de maneira indireta. O extrato clorofórmico também evidenciou sinais de mutagenicidade na linhagem TA102. Nos demais casos a resposta mutagênica foi negativa. Os extratos metanólico e etanólico mostraram indícios de toxicidade nas linhagens TA97a, TA100 e TA102.

As frações aquosa e acetato de etila de *D. elliptica* também foram avaliadas quanto à mutagenicidade e os resultados estão apresentados na tabela 4. Em experimentos realizados em ausência e presença de ativação metabólica, a fração aquosa desta espécie evidenciou apenas indícios de mutagenicidade na linhagem TA97a, enquanto a fração acetato de etila mostrou o mesmo tipo de resposta, todavia, na linhagem TA98. Nos demais casos, a resposta mutagênica foi negativa. A fração aquosa mostrou sinais de toxicidade na linhagem TA100, em experimentos realizados com S9. Sinais de toxicidade foram observados com a fração acetato de etila nas linhagens TA97a, TA100 e TA102, na presença de ativação metabólica, e na linhagem TA100, sem metabolização.

Tabela 3

Atividade mutagênica dos extratos da planta *Davilla elliptica* nas linhagens TA98, TA97a, TA100 e TA102 de *Salmonella typhimurium*, em ausência e presença de ativação metabólica (S9).

Tratamento		Número de revertentes/placa (RM) em linhagens de <i>S.typhimurium</i> (M±SD)							
(mg/placa)		TA98		TA97a		TA100		TA102	
<i>D. elliptica</i>		-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9
MeOH									
0,00 ^a	24±4	22±3	162±15	143±8	113±15	142±16	316±12	244±26	
1,04	22±5(0,9)	49±6(2,2)*	186±32(1,2)	139±37(1,0)	132±6(1,2)	125±14(0,9)	298±11(0,9)	300±32(1,2)	
2,09	18±2(0,8)	47±4(2,1)**	165±19(1,0)	109±15(0,8)	122±13(1,1)	116±14(0,8)	275±31(0,9)	264±32(1,1)	
4,18	15±4(0,6)	41±4(1,9)*	182±5(1,1)	82±17(0,6)	105±3(0,9)	94±16(0,7)	233±4(0,7)	214±12(0,9)	
8,35	16±3(0,7)	42±2(1,9)**	180±30(1,1)	71±15(0,5)	113±10(1,0)	95±4(0,7)	159±1(0,5)	162±29(0,7)	
12,53	21±7(0,9)	34±4(1,5)	215±17(1,3)	69±7(0,5)	130±7(1,2)	90±8(0,6)	93±10(0,3)	138±15(0,6)	
C ^b	871±85	381±40	1115±8	813±10	1369±84	779±59	908±61	1688±36	
EtOH									
0,00 ^a	23±3	22±3	162±24	143±8	113±15	142±16	316±12	244±26	
1,04	27±12(1,2)	59±0(2,7)**	188±21(1,2)	181±6(1,3)	126±5(1,1)	128±14(0,9)	260±24(0,8)	341±50(1,4)	
2,09	27±5(1,2)	47±3(2,2)**	179±15(1,1)	125±5(0,9)	130±9(1,2)	111±12(0,8)	244±9(0,8)	230±15(0,9)	
4,18	16±2(0,7)	39±3(1,8)*	170±7(1,1)	98±7(0,7)	107±8(1,0)	102±10(0,7)	188±5(0,6)	237±9(1,0)	
8,35	27±7(1,2)	41±12(1,8)	208±8(1,3)	69±13(0,5)	111±8(1,0)	86±8(0,6)	160±56(0,5)	217±34(0,9)	
12,53	33±10(1,4)	33±5(1,5)	261±15(1,6)*	86±23(0,6)	120±24(1,1)	62±18(0,4)	142±42(0,5)	211±22(0,9)	
C ^b	536±58	381±40	1025±103	813±10	1369±84	779±59	908±61	1688±36	
CHCl₃									
0,00 ^a	17±4	22±3	162±15	143±8	188±50	142±16	316±12	244±26	
0,65	23±4(1,4)	54±4(2,5)**	181±7(1,1)	184±16(1,3)	158±18(0,8)	152±9(1,1)	310±10(1,0)	322±15(1,3)	
1,30	17±5(1,0)	59±7(2,7)**	191±20(1,2)	183±17(1,3)	167±16(0,9)	133±9(0,9)	315±56(1,0)	363±10(1,5)*	
2,60	16±6(1,0)	34±4(1,5)*	197±26(1,2)	171±19(1,2)	163±6(0,9)	135±5(1,0)	203±30(0,6)	341±10(1,4)	
5,20	16±3(0,9)	27±5(1,2)	236±15(1,5)*	188±16(1,3)	207±0(1,1)	160±22(1,1)	162±14(0,5)	239±18(1,0)	
7,80	19±6(1,1)	29±4(1,3)	192±19(1,2)	145±7(1,0)	205±38(1,1)	117±35(0,8)	125±9(0,4)	247±34(1,0)	
C ^b	463±59	381±40	1115±8	813±10	1118±3	779±59	908±61	1688±36	

*P<0,05 (ANOVA); **P<0,01 (ANOVA), M±SD= média±desvio padrão ^a Controle negativo: dimetilsulfóxido, 75µl/placa.

^b Controles positivos: 4-nitrofenilenodiamino, 10 µg/placa (TA98 e TA97a); azida sódica, 2,5µg/placa (TA100); mitomicina, 3µg/placa (TA102), em ausência de S9 e 2-antramino, 0,125µg/placa (TA98, TA97a,TA100); 2-aminofluoreno, 10µg/placa (TA102).

Tabela 4

Atividade mutagênica das frações aquosa e acetato de etila do extrato metanólico da planta *Davilla elliptica* nas linhagens TA98, TA97a, TA100 e TA102 de *Salmonella typhimurium*, em ausência e presença de ativação metabólica (S9).

Tratamento (mg/placa)	Número de revertentes/placa (RM) em linhagens de <i>S.typhimurium</i> (M±SD)							
	TA98		TA97a		TA100		TA102	
<i>D. elliptica</i>	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9
Aquosa								
0,00 ^a	21±4	18±2	107±9	147±16	147±10	147±10	285±4	301±18
2,56			189±8 (1,8)**		166±7 (1,1)	96±5 (0,7)		
5,13	20±1 (1,0)	15±2 (0,8)	171±12 (1,6)**	245±39 (1,7)*	151±18 (1,0)	97±6 (0,7)	256±1 (0,9)	288±19 (1,0)
10,26	24±3 (1,1)	15±4 (0,8)	120±7 (1,1)	231±31 (1,6)*	125±9 (0,9)	102±15 (0,7)	206±1 (0,7)	282±19 (0,9)
20,52	26±1 (1,2)	17±5 (0,9)	131±54 (1,2)	192±11 (1,3)	115±26 (0,8)	100±13 (0,7)	287±6 (1,0)	294±45 (1,0)
41,04	24±4 (1,1)	12±1 (0,7)	163±32 (1,5)	95±20 (0,6)	105±18 (0,7)	87±4 (0,6)	275±0 (1,0)	247±46 (0,8)
61,56	22±1 (1,0)	17±4 (0,9)	106±15 (0,7)			80±19 (0,5)	293±8 (1,0)	242±33 (0,8)
C ^b	3179±122	2227±78	683±20	1250±269	1306±66	1638±547	667±10	541±16
Acetato de etila								
0,00 ^a	21±4	18±2	191±6	147±16	106±17	93±13	256±34	301±18
1,31			185±13 (1,0)	199±24 (1,4)			252±11 (1,0)	
2,63	28±2 (1,3)	27±5 (1,5)	194±8 (1,0)	227±7 (1,5)	95±15 (0,9)	109±22 (1,2)	219±13 (0,9)	283±9 (0,9)
5,26	38±4 (1,8)*	32±2 (1,8)**	150±24 (0,8)	232±45 (1,6)	101±9 (1,0)	114±7 (1,2)	178±36 (0,7)	273±33 (0,9)
10,52	37±0 (1,8)	25±3 (1,4)	131±50 (0,7)	191±61 (1,3)	95±16 (0,9)	73±14 (0,8)	198±3 (0,8)	217±22 (0,7)
21,04	35±4 (1,7)	30±10 (1,7)	131±11 (0,7)	54±6 (0,4)	113±3 (1,1)	75±8 (0,8)	229±49 (0,9)	285±55 (0,9)
31,56	33±4 (1,6)	22±7 (1,2)			59±17 (0,6)	53±16 (0,6)		199±31 (0,7)
C ^b	3179±122	2227±78	1749±222	1250±269	1497±89	1638±547	1499±138	541±16

*P<0,05 (ANOVA); **P<0,01 (ANOVA), M±SD= média±desvio padrão ^a Controle negativo: dimetilsulfóxido, 75µl/placa.

^b Controles positivos: 4-nitrofenilenodiamino, 10 µg/placa (TA98 e TA97a); azida sódica, 2,5µg/placa (TA100); mitomicina, 3µg/placa (TA102), em ausência de S9 e 2-antramino, 0,125 µg/placa (TA98, TA97a, TA100); 2-aminofluoreno, 10µg/placa (TA102).

5.2. Ensaios com plasmideo pUC9.1

Foi investigada a alteração da topologia do DNA plasmidial pUC9.1 através da incubação com concentrações crescentes das frações aquosa e acetato de etila do extrato metanólico das plantas *Davilla nitida* e *D. elliptica*, bem como com concentrações crescentes das substâncias puras - quercetina, miricetina, quercetina-3-O- α -L-rhamnopiranosídeo (quercetrina), miricetina-3-O- α -L-rhamnopiranosídeo (miricetrina) e ácido gálico – isoladas de *Davilla elliptica*.

A menor concentração das substâncias puras avaliada nesses ensaios (0,2 mM) foi retirada da literatura (Yoshino et al., 1999). As demais concentrações (das frações e das substâncias puras) foram determinadas na prática, quando diversos tratamentos foram testados e os que forneceram os melhores resultados foram estabelecidos para os ensaios.

Os ensaios foram realizados em triplicata e a concentração média, em percentagem, de cada conformação do DNA, nas amostras e nos controles, está apresentada em forma de gráfico de colunas, nas figuras 8 a 20. As melhores imagens das triplicatas também estão mostradas nas figuras.

Após tratamento do DNA plasmidial com as frações acetato de etila do extrato metanólico de *D. nitida* e *D. elliptica*, observou-se que, à medida que as concentrações das frações utilizadas aumentaram, houve redução da conformação superhelicoidizada do DNA (figuras 8 e 9). O número de quebras/genoma é determinado baseado na concentração do DNA superhelicoidizado. Caso esse índice fosse calculado, forneceria um número elevado de quebras, porque a concentração de DNA superhelicoidizado, nesses tratamentos, é baixa. Todavia, não houve aparecimento das conformações de DNA circular aberto e linear, que são indicativas de quebras. Sendo assim, não foi utilizada a distribuição de Poisson para

calcular o valor médio de quebras e os valores das concentrações das frações e das concentrações da conformação de DNA superhelicoidizado, em cada tratamento, foram submetidos a uma regressão linear. Aplicando-se o teste *t* sobre os dados da regressão, pôde-se verificar existência de relação linear entre as variáveis (p-valor = 0,01, para *D. nitida* e *D. elliptica*), ao nível de 5% de confiança ($\alpha = 0,05$).

Para elucidar a redução da conformação superhelicoidizada do DNA após tratamento com as frações acetato de etila das plantas, foram realizadas corridas eletroforéticas em que alíquotas do DNA plasmidial tratado com concentrações crescentes dessas amostras foram aplicadas em gel de agarose a 0,8%, previamente corado com excesso de brometo de etídeo (6 μ g/mL), na tentativa de verificar uma possível interação da mistura de flavonóides das amostras com o corante do DNA, o que o tornaria menos disponível, no gel, para intercalar-se ao DNA, deixando, assim, as bandas menos evidentes.

As figuras 10 e 11 mostram que, nessa situação experimental, deixa de haver relação linear entre aumento das concentrações das amostras e redução da conformação superhelicoidizada do DNA (teste *t* sobre os dados da regressão linear, p-valor = 0,84, para *D. nitida* e 0,07, para *D. elliptica*, com $\alpha = 0,05$), evidenciando que as frações acetato de etila de *D. nitida* e *D. elliptica* não promovem nenhum tipo de dano ao DNA plasmidial.

A influência das frações aquosas do extrato metanólico das plantas *D. nitida* e *D. elliptica* sobre a integridade do plasmídeo pUC9.1 foi testada, e as figuras 12 e 13 revelam a inocuidade de ambas ao DNA, uma vez que, após calcular o valor médio de quebras para cada tratamento, usando distribuição de Poisson, observou-se que não foi gerado número significativo de quebras por genoma em nenhuma das concentrações testadas, ao nível de 5% de confiança ($\alpha = 0,05$) (ANOVA, p-valor = 0,5, para *D. nitida* e 0,1, para *D. elliptica*).

A mesma resposta foi observada quando o DNA plasmidial foi incubado com as substâncias puras isoladas das plantas (figuras 14 a 18). Em nenhuma das concentrações testadas, nenhuma das substâncias puras induziu número significativo de quebras por genoma (ANOVA, p-valor = 0,2, para quercetina, 0,6, para quercetrina, 0,3, para miricetina, 0,4, para miricetrina e 0,2, para ácido gálico, com $\alpha = 0,05$).

Face a esses resultados, foram realizados ensaios em que o plasmídeo pUC9.1 foi incubado com as substâncias quercetina, miricetina, quercetina-3-O- α -L-rhamnopiranosídeo (quercetrina), miricetina-3-O- α -L-rhamnopiranosídeo (miricetrina) e ácido gálico, na presença de sulfato de cobre II. A figura 19 apresenta a alteração na topologia do DNA plasmidial e o número estatisticamente significativo de quebras por genoma induzido por essas substâncias, nessa condição, ao nível de 5% de confiança ($\alpha = 0,05$) (teste *t*, p-valor = 0,02, para quercetina, 0,04, para miricetina, 0,03, para quercetrina, 0,009, para miricetrina e 0,04, para ácido gálico). Quercetina, miricetina, miricetrina e ácido gálico converteram a maior parte do DNA superhelicoidizado íntegro em DNA circular aberto e linear, indicando a ocorrência de quebras do DNA em fita simples e fita dupla, respectivamente. Quercetrina também induziu quebras nas fitas do DNA, porém, de maneira mais branda. Miricetina e ácido gálico induziram número médio de quebras por genoma significativamente maior que quercetrina e miricetrina, ao nível de 5% de confiança ($\alpha = 0,05$) (ANOVA, p-valor = 0,004, teste de Tukey).

As frações acetato de etila e aquosa de *D. nitida* e *D. elliptica* também foram testadas na presença de sulfato de cobre II e o resultado está apresentado na figura 20. Na presença de cobre, não só as frações acetato de etila, como também as frações aquosa das plantas, induziram quebras em fita simples e na dupla fita do DNA plasmidial, além de

promoverem a quase completa degradação do plasmídeo pUC9.1 a pequenos fragmentos, efeito que pode ser mais claramente observado após tratamento com as frações acetato de etila. O valor médio de quebras induzido, em cada um desses tratamentos, não foi calculado, visto que não foi possível determinar nenhuma concentração de DNA superhelicoidizado, após tratamento do DNA plasmidial com a concentração utilizada das amostras.

A influência do sulfato de cobre sobre a integridade do plasmídeo pUC9.1 foi verificada e observou-se seu potencial não-genotóxico, uma vez que não houve alteração significativa da conformação superhelicoidizada do DNA plasmidial (figura 20, raia 1).

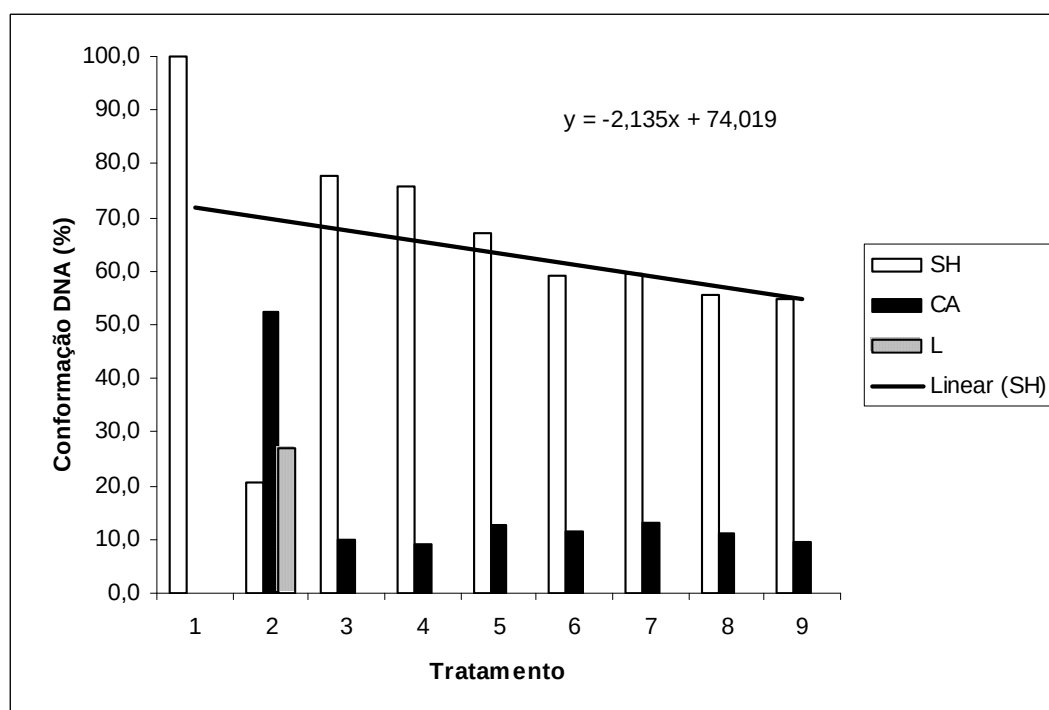
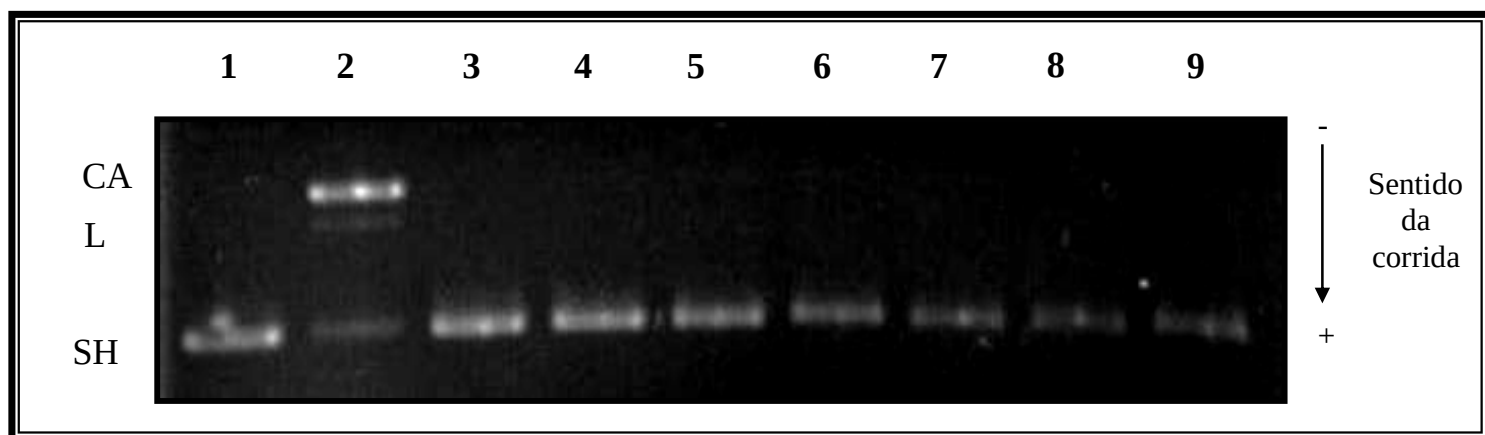


Figura 8. Eletroforese em gel de agarose a 0,8% e análise densitométrica das concentrações das conformações superhelicoidizada (SH), circular aberta (CA) e linear (L) do plasmídeo pUC9.1, após tratamento com as seguintes concentrações da fração acetato de etila de *D. nitida*. Raia 1: Controle - (DMSO), Raia 2: Controle + (200µg/mL SnCl₂), Raia 3 (0,5mg/mL), Raia 4 (2,5mg/mL), Raia 5 (5,0mg/mL), Raia 6 (12,5mg/mL), Raia 7 (17,5mg/mL), Raia 8 (20,0mg/mL), Raia 9 (25,0mg/mL).

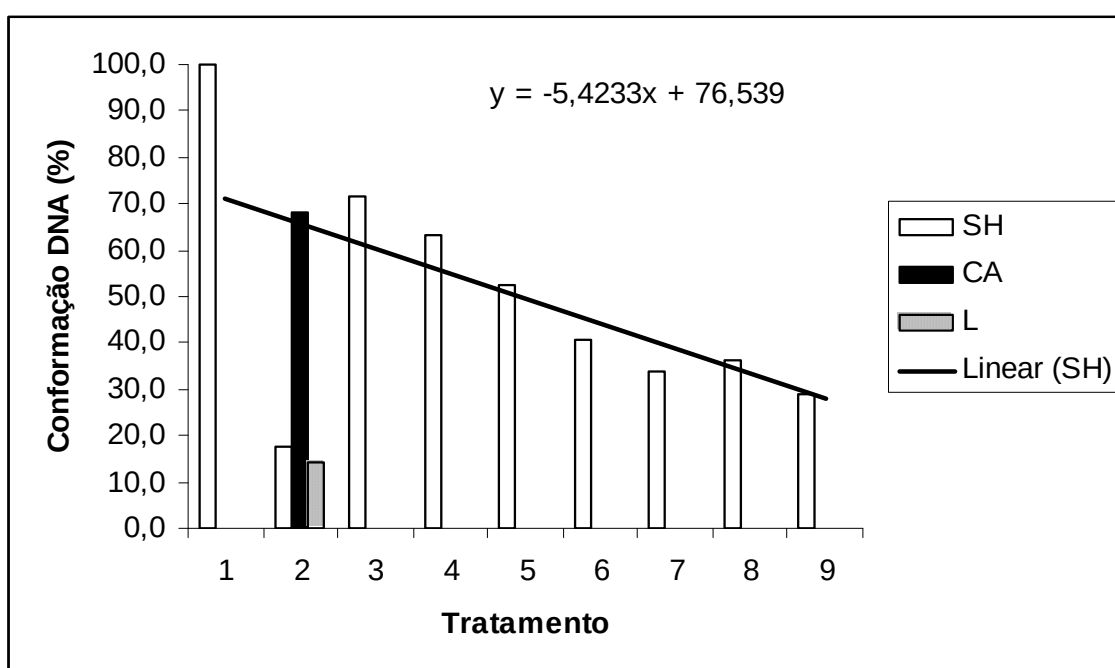
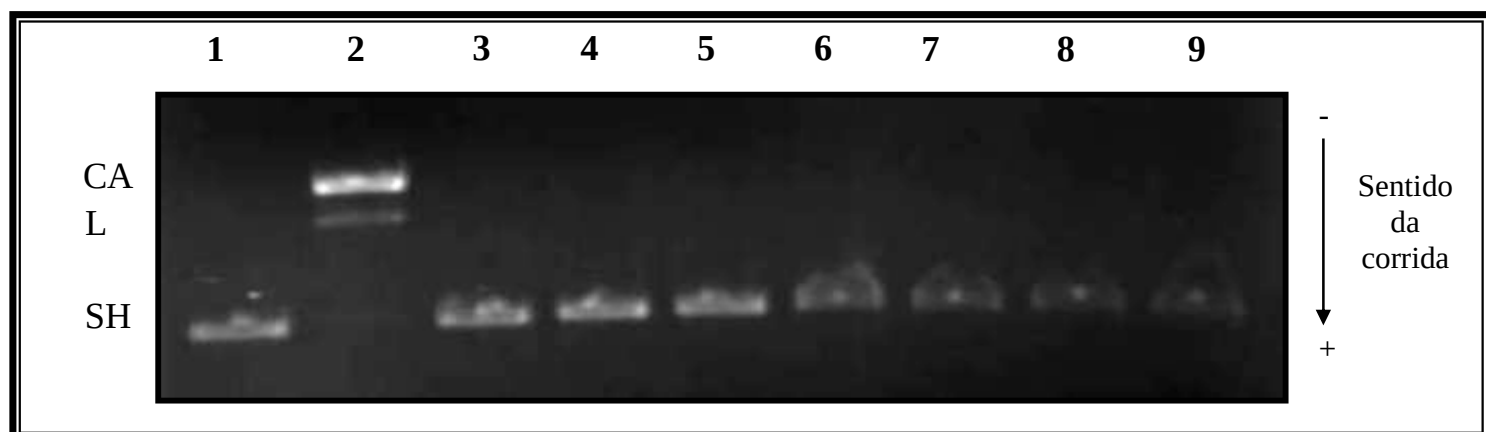


Figura 9. Eletroforese em gel de agarose a 0,8% e análise densitométrica das concentrações das conformações superhelicoidizada (SH), circular aberta (CA) e linear (L) do plasmídeo pUC9.1, após tratamento com as seguintes concentrações da fração acetato de etila de *D. elliptica*. Raia 1: Controle - (DMSO), Raia 2: Controle + (200µg/mL SnCl₂), Raia 3 (0,5mg/mL), Raia 4 (2,5mg/mL), Raia 5 (5,0mg/mL), Raia 6 (12,5mg/mL), Raia 7 (17,5mg/mL), Raia 8 (20,0mg/mL), Raia 9 (25,0mg/mL).

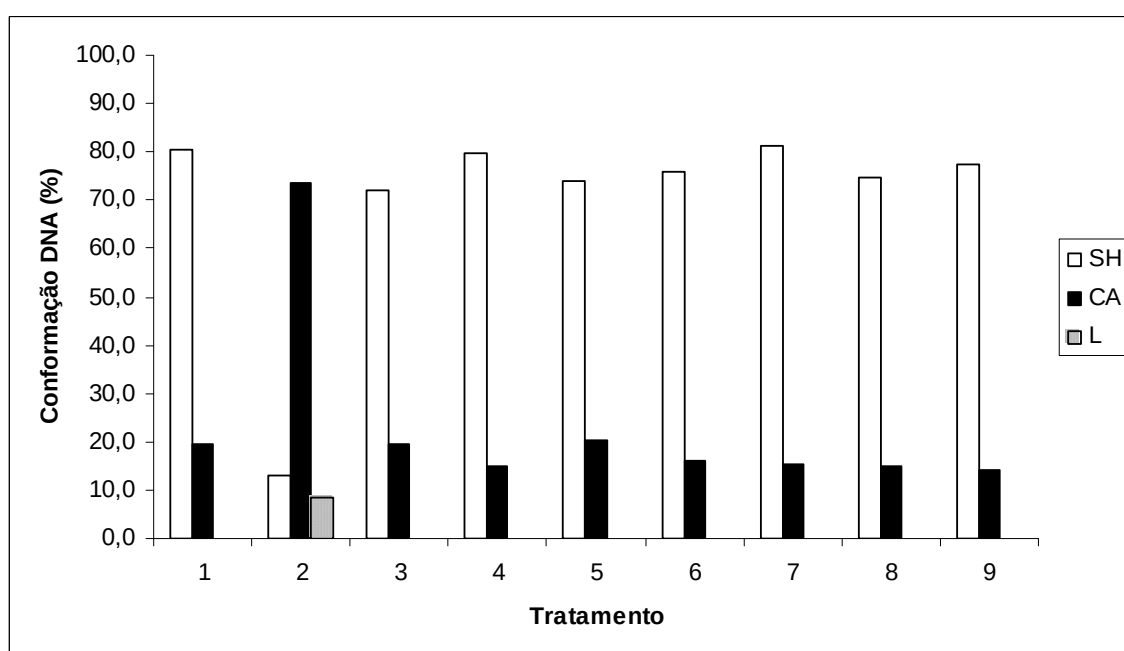
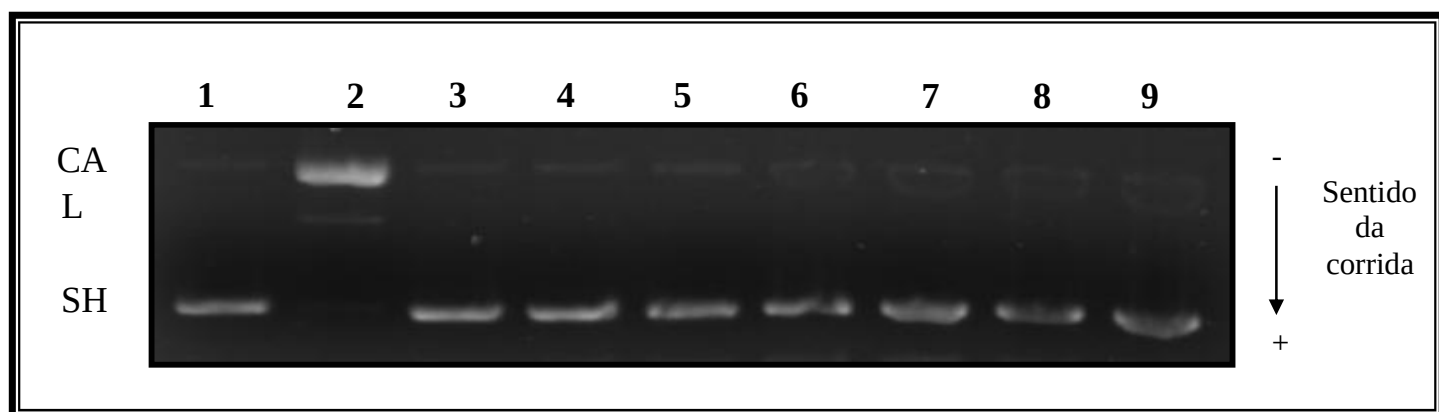


Figura 10. Eletroforese em gel de agarose a 0,8%, previamente corado com excesso de brometo de etídeo, e análise densitométrica das concentrações das conformações superhelicoidizada (SH), circular aberta (CA) e linear (L) do plasmídeo pUC9.1, após tratamento com as seguintes concentrações da fração acetato de etila de *D. nitida*. Raia 1: Controle - (DMSO), Raia 2: Controle + (200µg/mL SnCl₂), Raia 3 (0,5mg/mL), Raia 4 (2,5mg/mL), Raia 5 (5,0mg/mL), Raia 6 (12,5mg/mL), Raia 7 (17,5mg/mL), Raia 8 (20,0mg/mL), Raia 9 (25,0mg/mL).

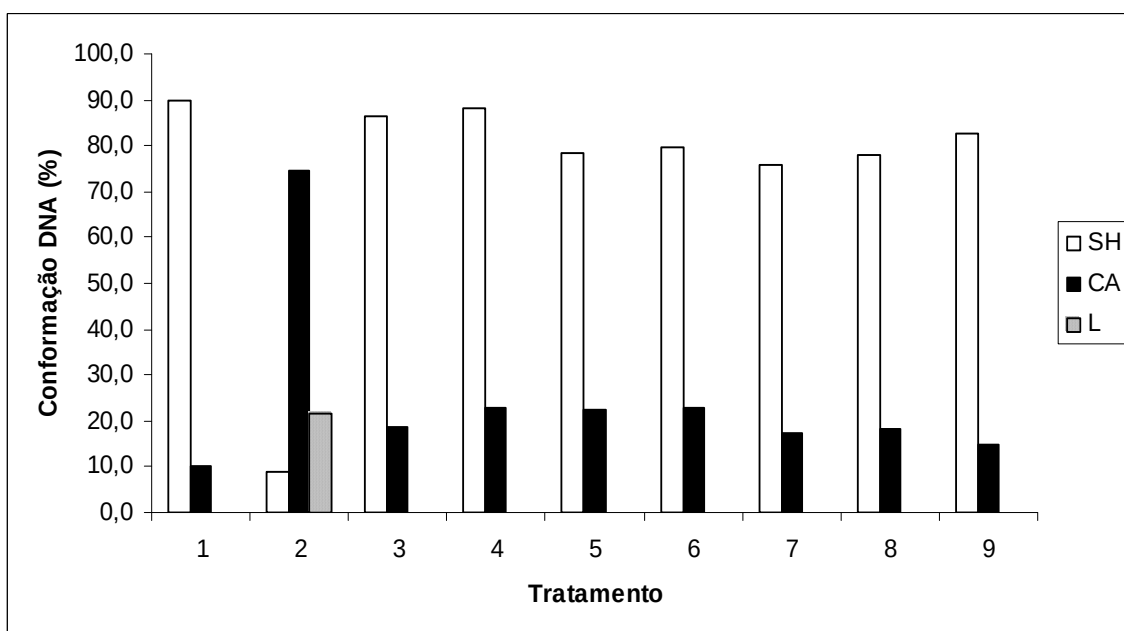
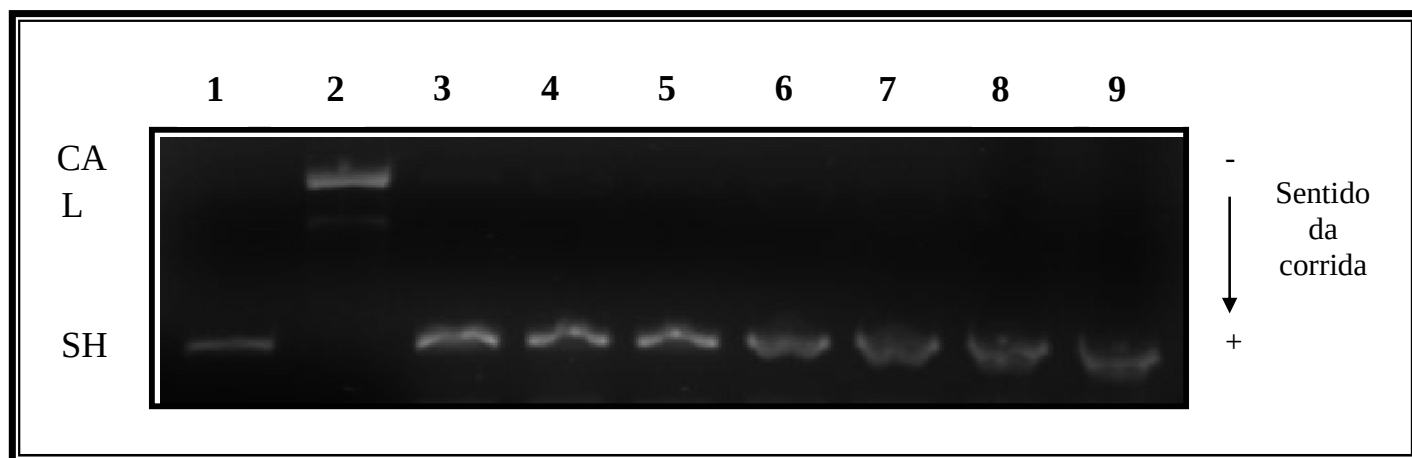
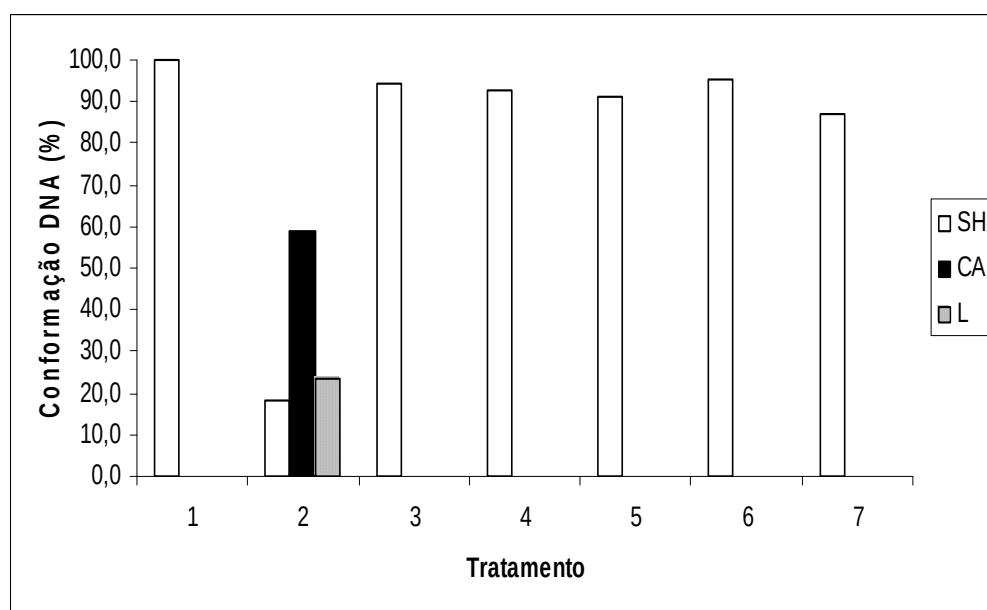
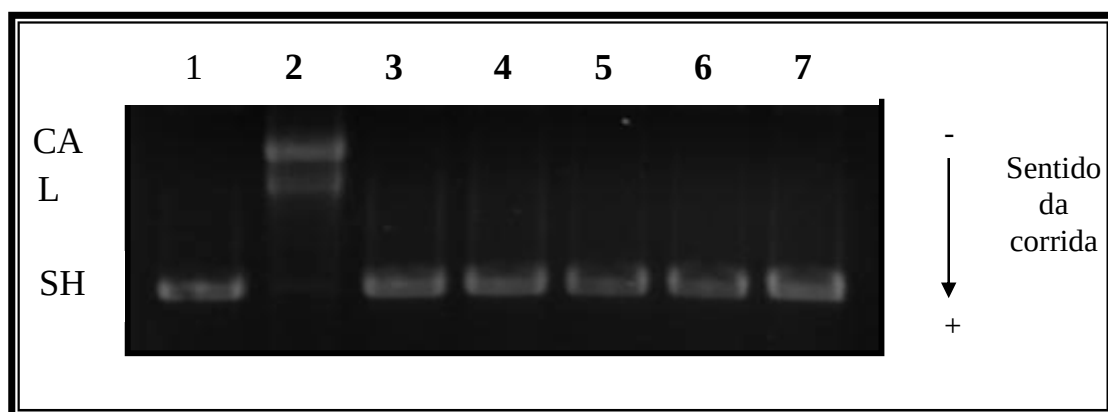
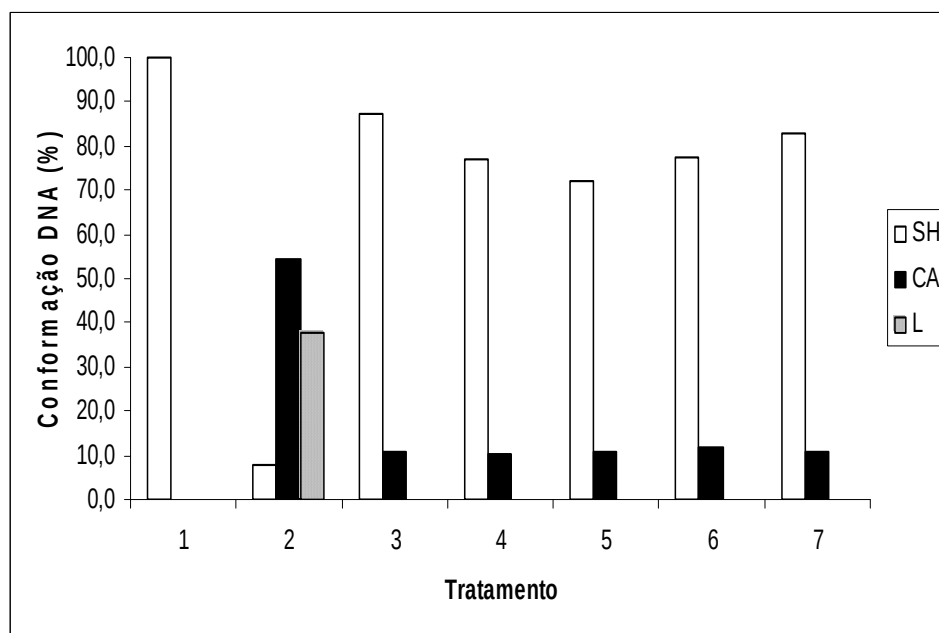
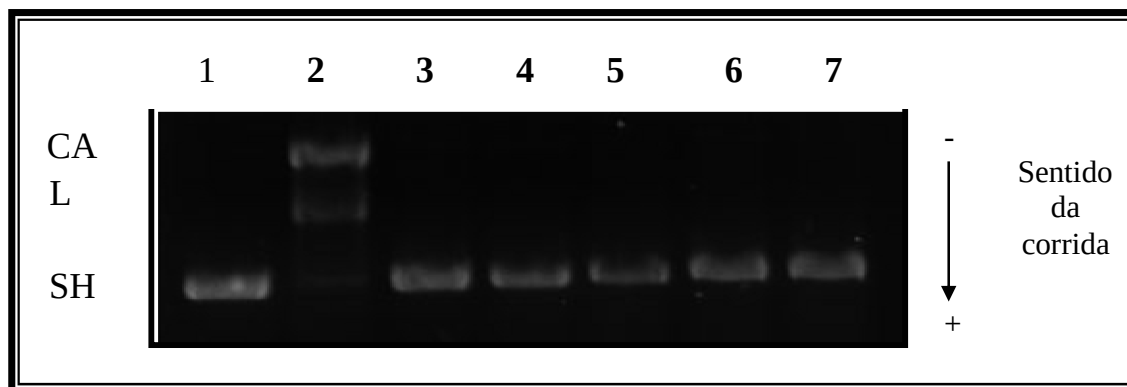


Figura 11. Eletroforese em gel de agarose a 0,8%, previamente corado com excesso de brometo de etídeo, e análise densitométrica das concentrações das conformações superhelicoidizada (SH), circular aberta (CA) e linear (L) do plasmídeo pUC9.1, após tratamento com as seguintes concentrações da fração acetato de etila de *D. elliptica*. Raia 1: Controle - (DMSO), Raia 2: Controle + (200µg/mL SnCl₂), Raia 3 (0,5mg/mL), Raia 4 (2,5mg/mL), Raia 5 (5,0mg/mL), Raia 6 (12,5mg/mL), Raia 7 (17,5mg/mL), Raia 8 (20,0mg/mL), Raia 9 (25,0mg/mL).



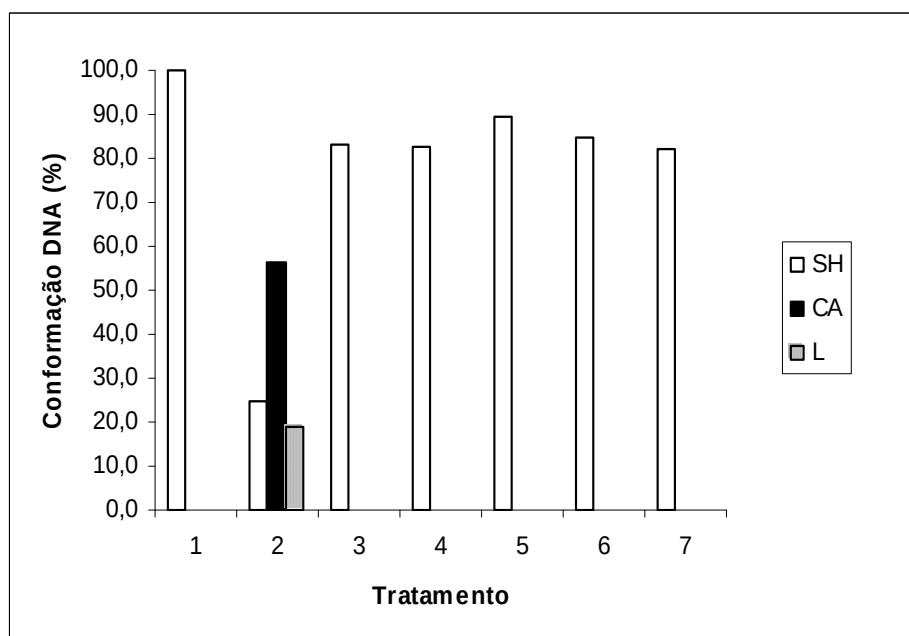
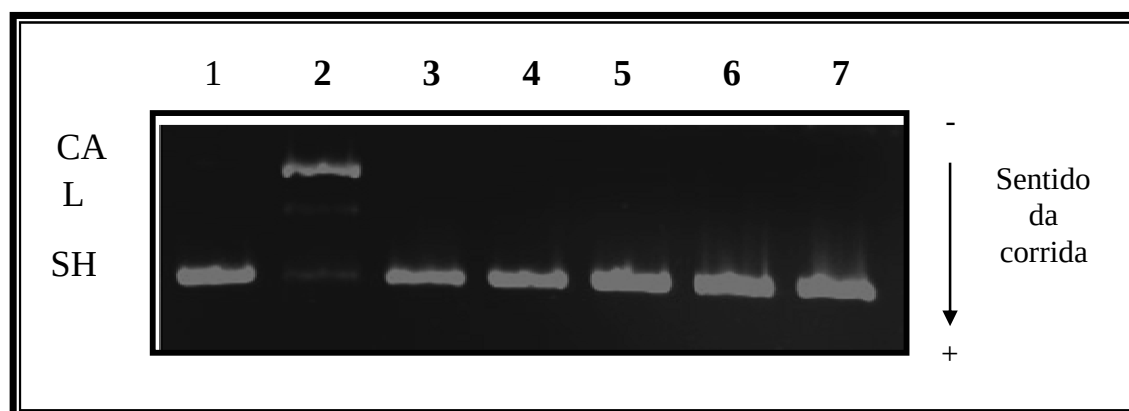
Tratamento	Quebras/ genoma
1	0,00
2	1,73
3	0,27
4	0,07
5	0,10
6	0,03
7	0,30

Figura 12. Eletroforese em gel de agarose a 0,8%, análise densitométrica das concentrações das conformações superhelicoidizada (SH), circular aberta (CA) e linear (L) do plasmídeo pUC9.1 e número de quebras/genoma no DNA plasmidial, após tratamento com as seguintes concentrações da fração aquosa de *D. nitida*. Raia 1: Controle - (DMSO), Raia 2: Controle + (200µg/mL SnCl₂), Raia 3 (5,0mg/mL), Raia 4 (12,5mg/mL), Raia 5 (17,5mg/mL), Raia 6 (20,0mg/mL), Raia 7 (25,0mg/mL).



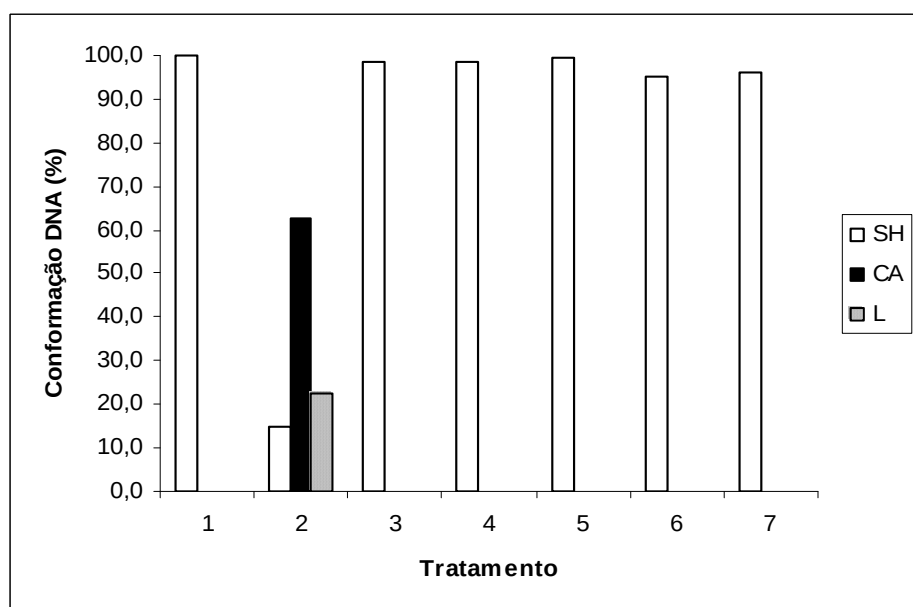
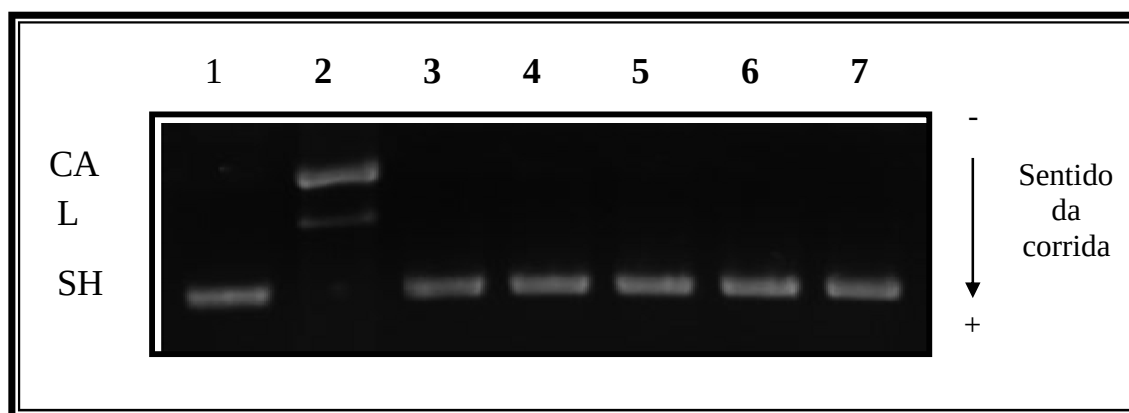
Tratamento	Quebras/ genoma
1	0,00
2	3,10
3	0,10
4	0,30
5	0,35
6	0,20
7	0,15

Figura 13. Eletroforese em gel de agarose a 0,8%, análise densitométrica das concentrações das conformações superhelicoidizada (SH), circular aberta (CA) e linear (L) do plasmídeo pUC9.1 e número de quebras/genoma no DNA plasmidial, após tratamento com as seguintes concentrações da fração aquosa de *D. elliptica*. Raia 1: Controle - (DMSO), Raia 2: Controle + (200µg/mL SnCl₂), Raia 3 (5,0mg/mL), Raia 4 (12,5mg/mL), Raia 5 (17,5mg/mL), Raia 6 (20,0mg/mL), Raia 7 (25,0mg/mL).



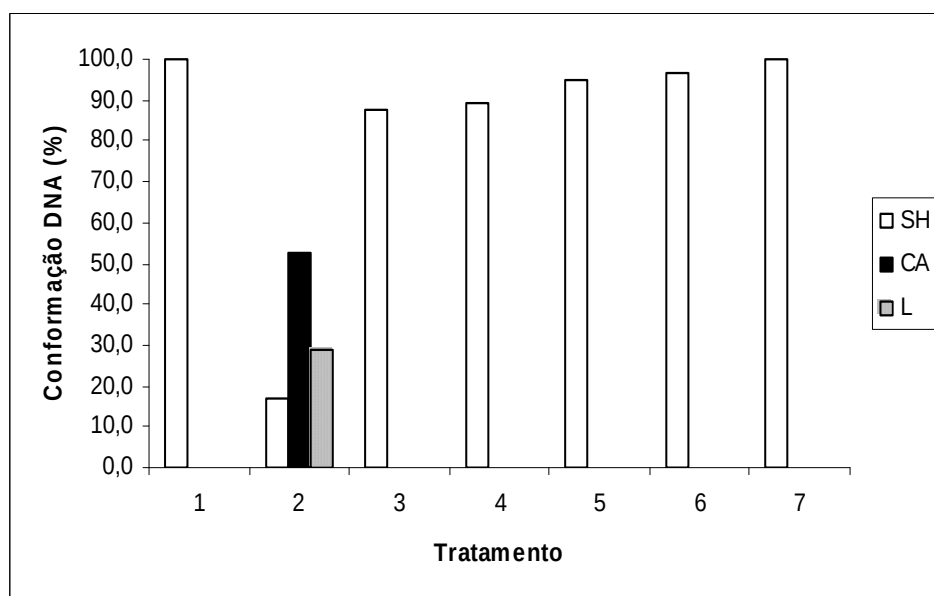
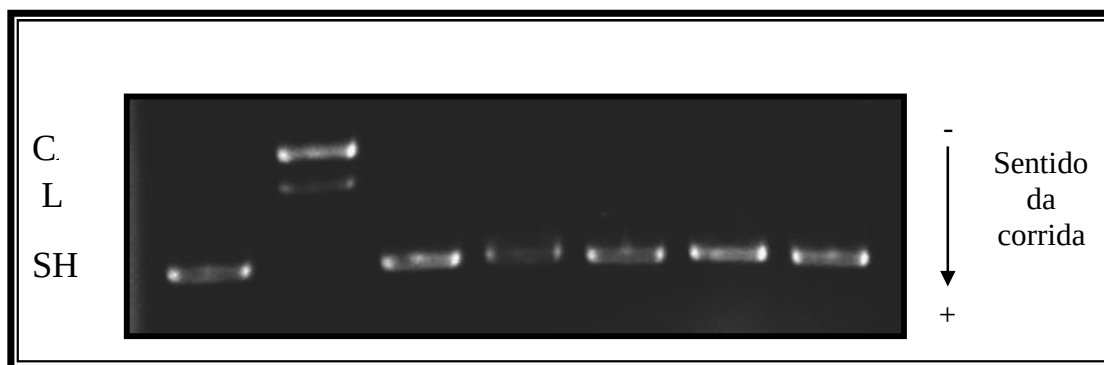
Tratamento	Quebras/ genoma
1	0,00
2	2,90
3	0,20
4	0,17
5	0,07
6	0,13
7	0,23

Figura 14. Eletroforese em gel de agarose a 0,8%, análise densitométrica das concentrações das conformações superhelicoidizada (SH), circular aberta (CA) e linear (L) do plasmídeo pUC9.1 e número de quebras/genoma no DNA plasmidial, após tratamento com as seguintes concentrações de quercetina. Raia 1: Controle - (DMSO), Raia 2: Controle + (200µg/mL SnCl₂), Raia 3 (0,2mM), Raia 4 (1,0mM), Raia 5 (2,0mM), Raia 6 (5,0mM), Raia 7 (10,0mM).



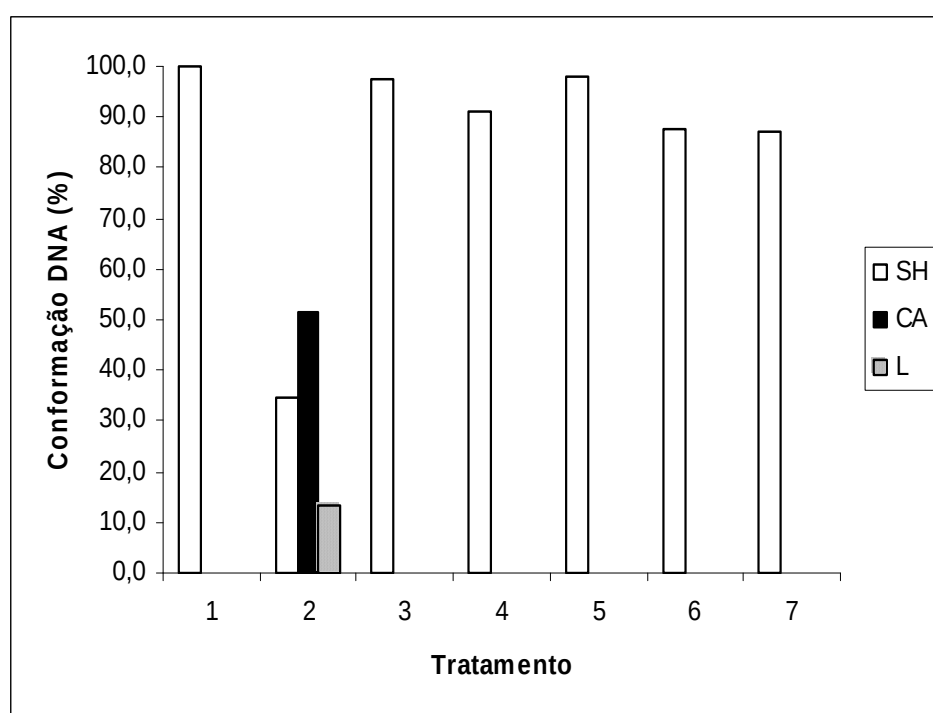
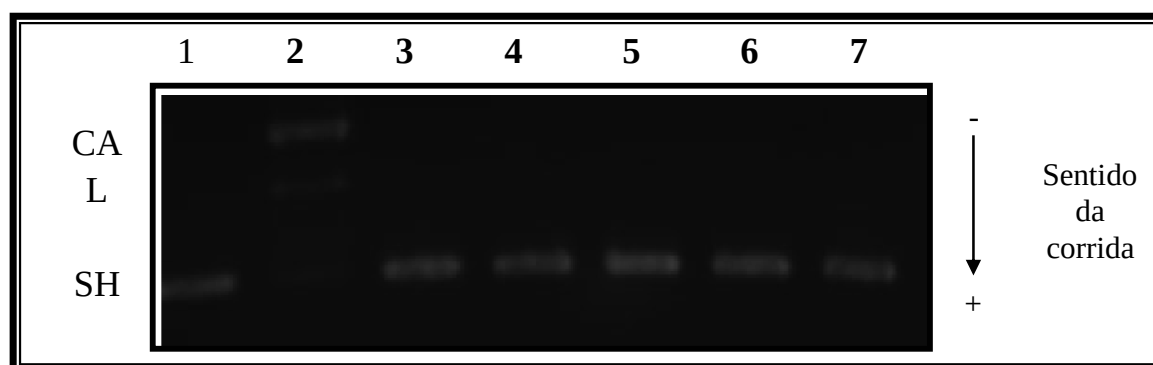
Tratamento	Quebras/ genoma
1	0,00
2	2,07
3	0,03
4	0,00
5	0,00
6	0,03
7	0,00

Figura 15. Eletroforese em gel de agarose a 0,8%, análise densitométrica das concentrações das conformações superhelicoidizada (SH), circular aberta (CA) e linear (L) do plasmídeo pUC9.1 e número de quebras/genoma no DNA plasmidial, após tratamento com as seguintes concentrações de quercetina-3-O- α -L-rhamnopiranosídeo (quercetrina). Raia 1: Controle - (DMSO), Raia 2: Controle + (200 μ g/mL SnCl₂), Raia 3 (0,2mM), Raia 4 (1,0mM), Raia 5 (2,0mM), Raia 6 (5,0mM), Raia 7 (10,0mM).



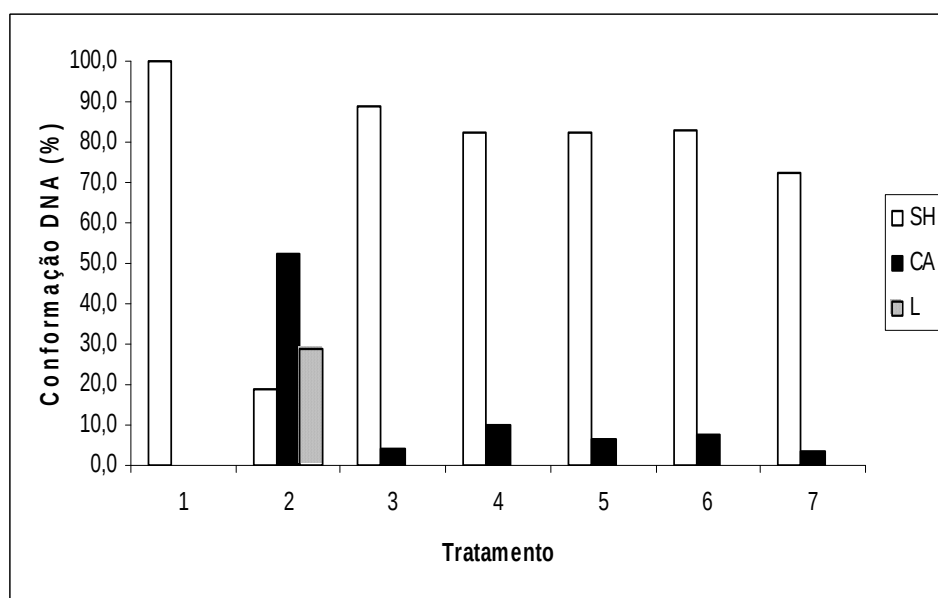
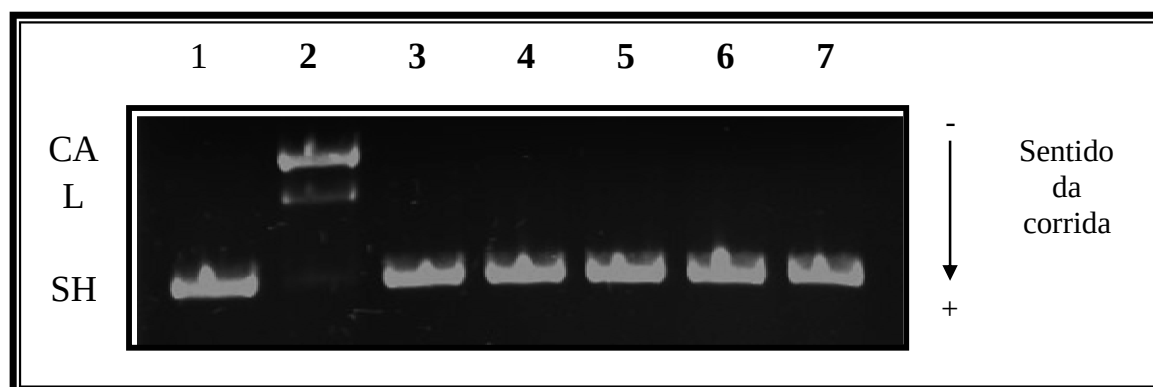
Tratamento	Quebras/ genoma
1	0,00
2	1,83
3	0,10
4	0,10
5	0,03
6	0,03
7	0,00

Figura 16. Eletroforese em gel de agarose a 0,8%, análise densitométrica das concentrações das conformações superhelicoidizada (SH), circular aberta (CA) e linear (L) do plasmídeo pUC9.1 e número de quebras/genoma no DNA plasmidial, após tratamento com as seguintes concentrações de miricetina. Raia 1: Controle - (DMSO), Raia 2: Controle + (200µg/mL SnCl₂), Raia 3 (0,2mM), Raia 4 (1,0mM), Raia 5 (2,0mM), Raia 6 (5,0mM), Raia 7 (10,0mM).



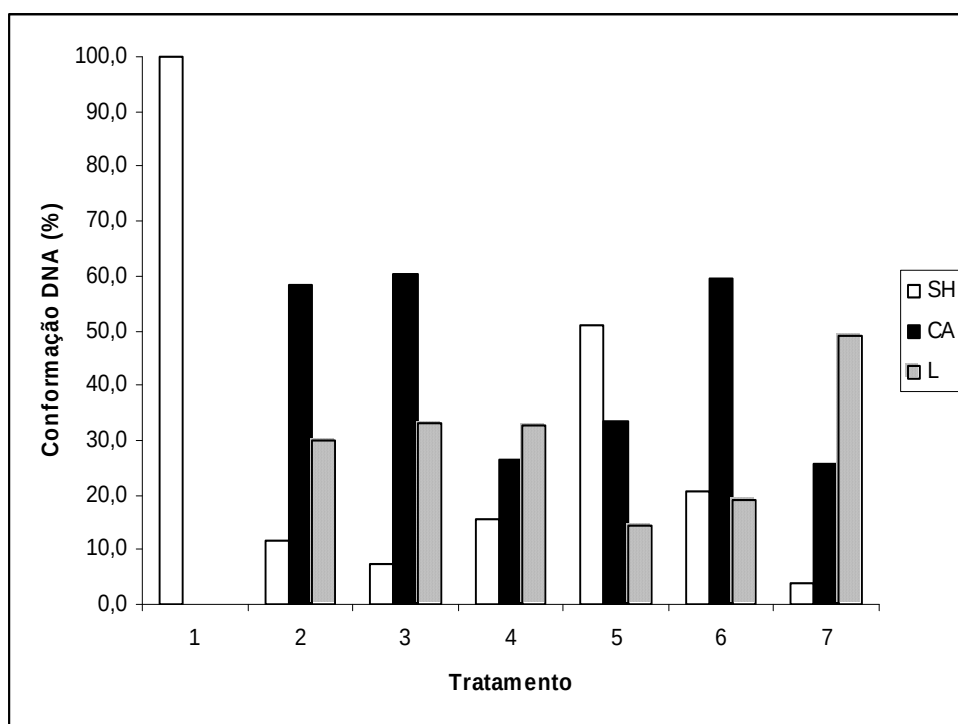
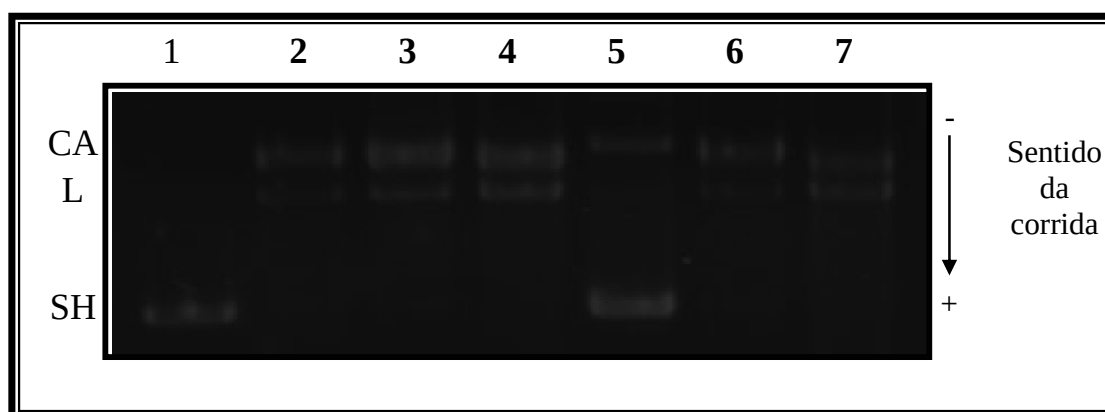
Tratamento	Quebras/ genoma
1	0,00
2	1,08
3	0,03
4	0,10
5	0,03
6	0,20
7	0,10

Figura 17. Eletroforese em gel de agarose a 0,8%, análise densitométrica das concentrações das conformações superhelicoidizada (SH), circular aberta (CA) e linear (L) do plasmídeo pUC9.1 e número de quebras/genoma no DNA plasmidial, após tratamento com as seguintes concentrações de miricetina-3-O- α -L-rhamnopiranosídeo (miricetrina). Raia 1: Controle - (DMSO), Raia 2: Controle + (200 μ g/mL SnCl₂), Raia 3 (0,2mM), Raia 4 (1,0mM), Raia 5 (2,0mM), Raia 6 (5,0mM), Raia 7 (10,0mM).



Tratamento	Quebras/ genoma
1	0,00
2	1,60
3	0,10
4	0,17
5	0,20
6	0,20
7	0,37

Figura 18. Eletroforese em gel de agarose a 0,8%, análise densitométrica das concentrações das conformações superhelicoidizada (SH), circular aberta (CA) e linear (L) do plasmídeo pUC9.1 e número de quebras/genoma no DNA plasmidial, após tratamento com as seguintes concentrações de ácido gálico. Raia 1: Controle - (DMSO), Raia 2: Controle + (200µg/mL SnCl₂), Raia 3 (0,2mM), Raia 4 (1,0mM), Raia 5 (2,0mM), Raia 6 (5,0mM), Raia 7 (10,0mM).



Tratamento	Quebras/ genoma
1	0,00
2	1,84
3	2,30*
4	3,84*
5	0,71*
6	1,47*
7	3,84*

Figura 19. Eletroforese em gel de agarose a 0,8%, análise densitométrica das concentrações das conformações superhelicoidizada (SH), circular aberta (CA) e linear (L) do plasmídeo pUC9.1 e número de quebras/genoma no DNA plasmidial, após tratamento com flavonóides e ácido gálico na presença de cobre II. Raia 1: Controle - (DMSO), Raia 2: Controle + (200µg/mL SnCl₂), Raia 3: quercetina 0,2mM + CuSO₄ 0,2mM, Raia 4: miricetina 0,2mM + CuSO₄ 0,2mM, Raia 5: quercetina-3-O-α-L-rhamnopiranosídeo (quercetrina) 0,2mM + CuSO₄ 0,2mM, Raia 6: miricetina-3-O-α-L-rhamnopiranosídeo (miricetrina) 0,2mM + CuSO₄ 0,2mM, Raia 7: ácido gálico 0,2mM + CuSO₄ 0,2mM. * P < 0,05 (teste t)

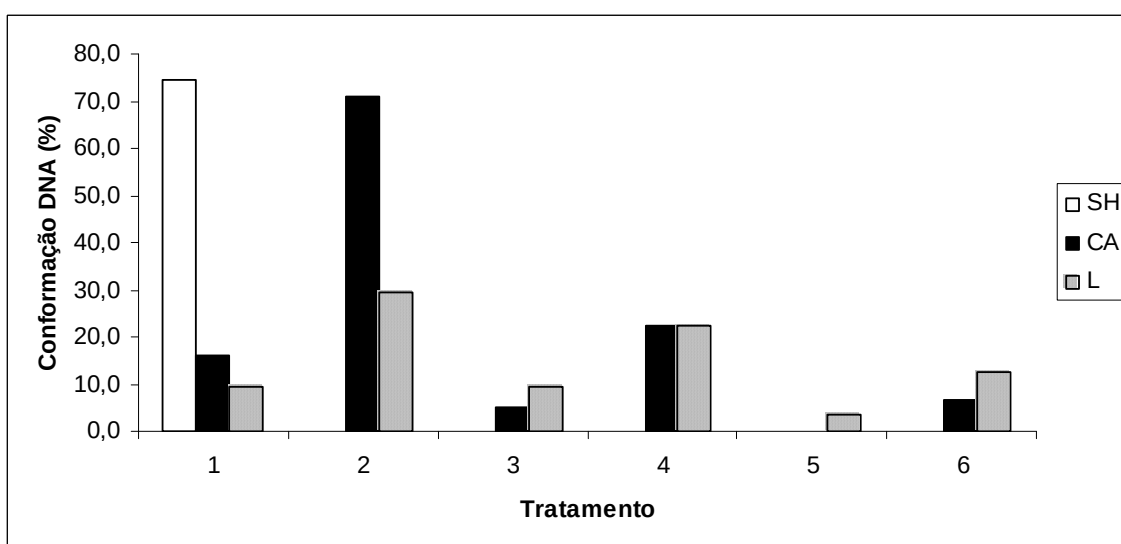
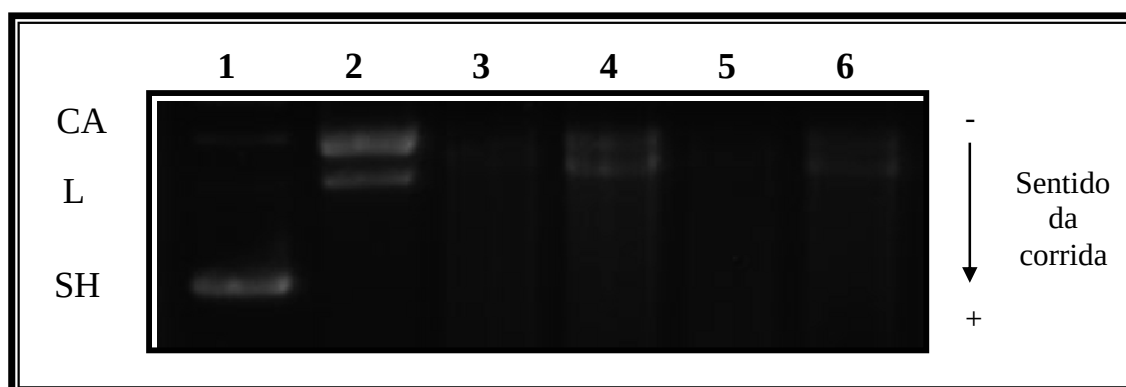


Figura 20. Eletroforese em gel de agarose a 0,8% e análise densitométrica das concentrações das conformações superhelicoidizada (SH), circular aberta (CA) e linear (L) do plasmídeo pUC9.1, após tratamento com frações acetato de etila e aquosa de *D. nitida* e *D. elliptica*, na presença de cobre II. Raia 1: Controle - (DMSO + CuSO₄ 5mg/mL), Raia 2: Controle + (200µg/mL SnCl₂), Raia 3: fração acetato de etila de *D. nitida* 5mg/mL + CuSO₄ 5mg/mL, Raia 4: fração aquosa de *D. nitida* 5mg/mL + CuSO₄ 5mg/mL, Raia 5: fração acetato de etila de *D. elliptica* 5mg/mL + CuSO₄ 5mg/mL, Raia 6: Fração aquosa de *D. elliptica* 5mg/mL + CuSO₄ 5mg/mL.

5.3. Ensaio de proliferação com células MCF-7 (teste E-Screen)

5.3.1. Ensaio de citotoxicidade

O teste de viabilidade foi realizado para determinar o potencial citotóxico dos flavonóides quercetina, quercetina-3-*O*- α -L-rhamnopiranosídeo (quercetrina), miricetina e miricetina-3-*O*- α -L-rhamnopiranosídeo (miricetrina), isolados da planta *D. elliptica*, nas células MCF-7. Observou-se que, após 24 horas de incubação, quercetina e miricetina, nas duas concentrações testadas, não promoveram efeitos citotóxicos; 100 e 200 μ M de quercetina-3-*O*- α -L-rhamnopiranosídeo (quercetrina) e miricetina-3-*O*- α -L-rhamnopiranosídeo (miricetrina), apesar de não induzirem citotoxicidade, inibiram a multiplicação celular. Após 48 horas de incubação, quercetina 100 e 200 μ M, miricetina 100 μ M e miricetina-3-*O*- α -L-rhamnopiranosídeo (miricetrina) 200 μ M induziram redução da viabilidade celular. Após 72 horas de incubação, citotoxicidade foi observada com a todas as amostras, na maioria das concentrações testadas, exceto com quercetina-3-*O*- α -L-rhamnopiranosídeo (quercetrina) 100 μ M (figura 21).

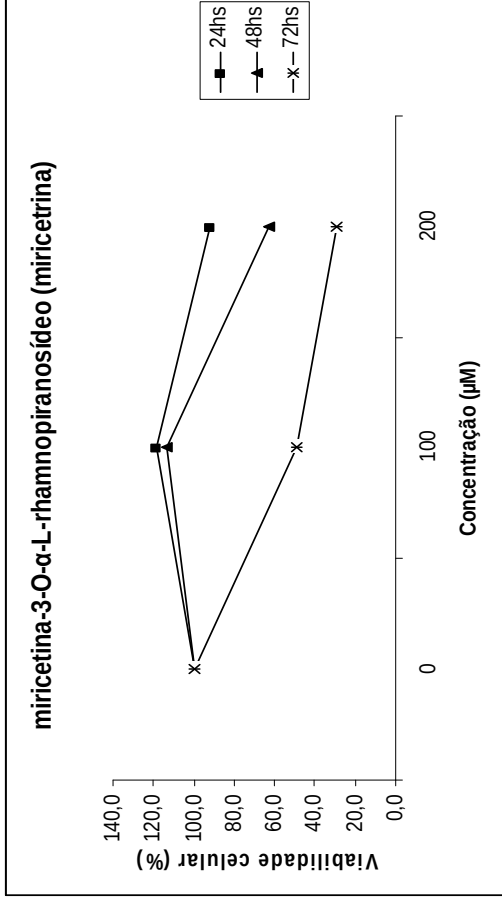
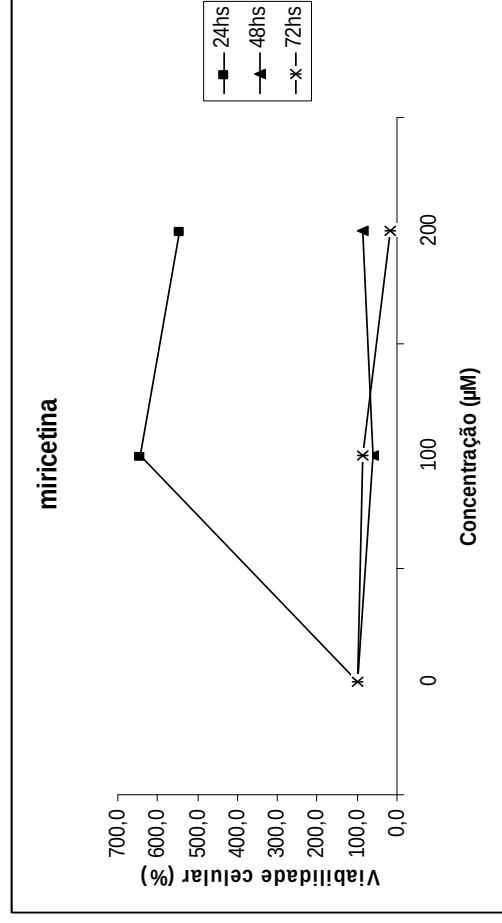
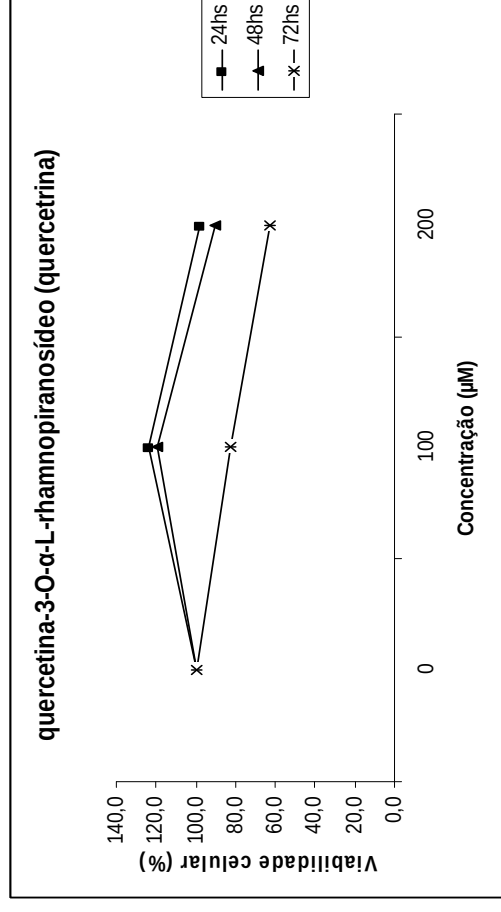
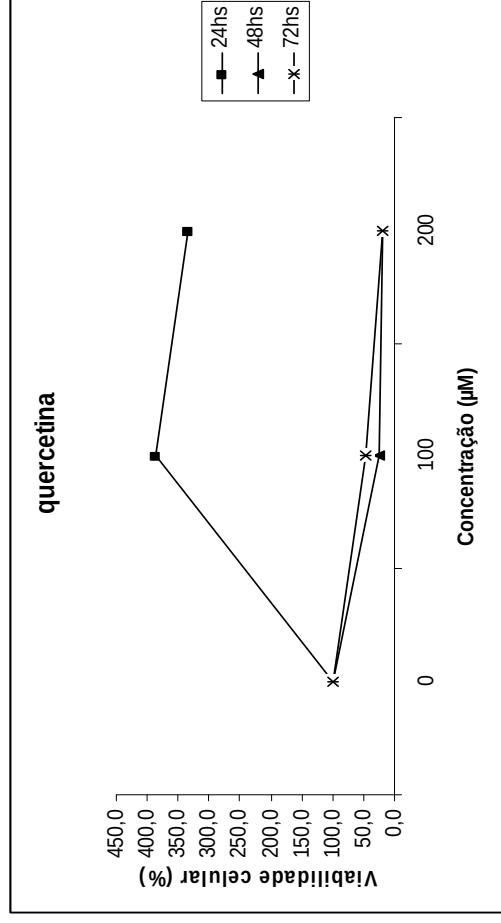


Figura 21. Efeito da quercetina, quercetina-3-O-α-L-rhamnopiranosídeo (quercetrina), miricetina e miricetina-3-O-α-L-rhamnopiranosídeo (miricetrina) sobre a viabilidade das células MCF-7. As células MCF-7 foram tratadas com as amostras por 24, 48 e 72 horas (hs). Os resultados estão expressos como percentagem de células sobreviventes em relação ao controle negativo, representado como concentração zero. Os dados estão apresentados como viabilidade celular média (n = 3).

5.3.2. Ensaio E-Screen

Foi investigado o potencial fitoestrogênico dos flavonóides quercetina, quercetina-3-O- α -L-rhamnopiranosídeo (quercetrina), miricetina e miricetina-3-O- α -L-rhamnopiranosídeo (miricetrina), isolados de *Davilla elliptica*, através da avaliação da proliferação das células MCF-7 induzida por esses compostos.

A figura 22 mostra o efeito proliferativo do 17- β -estradiol, das substâncias em análise e de um controle livre de estrógenos (controle negativo). Pode-se notar que, o 17- β -estradiol, além de não estimular a frequência de proliferação celular, promoveu a morte das células MCF-7 inicialmente semeadas, em todas as concentrações utilizadas. Não obstante, os flavonóides testados também não induziram a proliferação celular de maneira significativa, quando comparados ao controle negativo, em nenhum dos tratamentos realizados (p-valor = 0,2, para 17- β -estradiol, 0,06, para quercetina, 0,4, para quercetrina, 0,9, para miricetina e miricetrina).

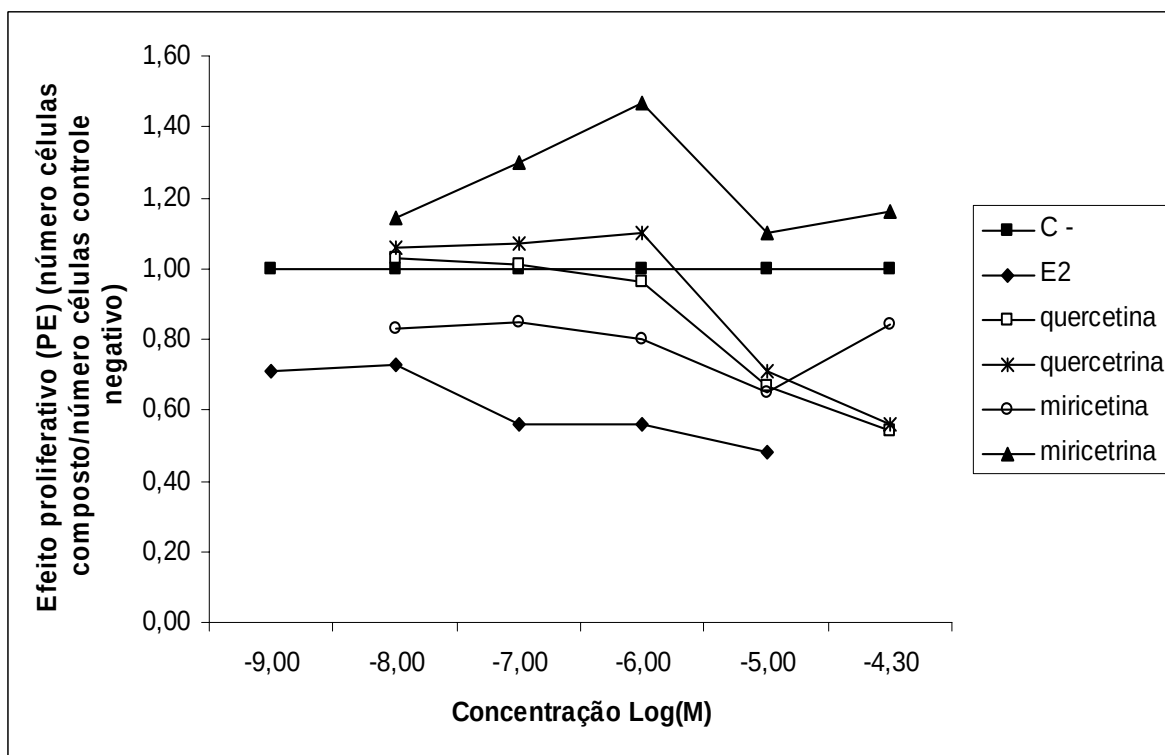


Figura 22. Efeito do 17- β -estradiol (E2) e dos principais flavonóides isolados das folhas de *D. elliptica* sobre a proliferação das células MCF-7. O controle negativo foi feito através da incubação das células com meio livre de estrógenos (meio experimental) e está indicado na linha horizontal. Os resultados estão expressos como efeito proliferativo médio ($n = 3$).

6. *Discussão*

“O saber a gente aprende com os mestres e com os livros. A sabedoria se aprende com a vida e com os humildes”.

Cora Coralina

6.1. Mutagenicidade

Produtos derivados de plantas têm sido freqüentemente usados pela população humana no tratamento e prevenção de doenças (Dias et al.,1995) e estima-se que mais de 80% da população mundial utiliza plantas como fonte primária de agentes terapêuticos (Cordell, 1995). Grande parte da população de países em desenvolvimento usa preparações vegetais como primeiros cuidados à saúde, isto porque estes são mais aceitos sob uma perspectiva cultural e também devido ao alto custo dos medicamentos alopáticos (Addae-Mensah,1992).

Nas últimas décadas, muitos estudos têm sido dirigidos à identificação de produtos naturais com propriedades terapêuticas (Hamburger e Hostetmann, 1991; Weisburger et al., 1996; Silva et al., 1997; Bae et al., 2002). Plantas e seus metabólitos têm se tornado, para a indústria farmacêutica, valiosos recursos na pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos (Van Wyk et al., 1997).

Embora plantas medicinais venham sendo utilizadas no tratamento de doenças de acordo com o conhecimento acumulado ao longo dos tempos, a pesquisa científica tem mostrado que algumas substâncias presentes nessas plantas podem apresentar propriedades indesejáveis, como mutagenicidade, carcinogenicidade e toxicidade, as quais podem restringir seu uso como agentes terapêuticos. (Simões et al., 1999, De Sá Ferreira et al., 1999).

Recentemente, os aspectos farmacológicos e toxicológicos de plantas medicinais tornaram-se alvo de interesse da comunidade científica, com o objetivo de confirmar suas

propriedades terapêuticas, isolar seus compostos ativos e investigar seus possíveis efeitos tóxicos.

Davilla nitida Vahl. e *Davilla elliptica* St. Hil são plantas distribuídas nos biomas Cerrado da América do Sul, cujo uso popular aplica-se, principalmente, no tratamento de úlceras gástricas. Essas duas espécies de *Davilla* fazem parte da relação de plantas estudadas num projeto temático multidisciplinar intitulado *Uso Sustentável da Biodiversidade Brasileira: Prospecção Químico-Farmacológica em Plantas Superiores*, inserido no programa Biota – FAPESP, que tem o objetivo de detectar novas moléculas farmacologicamente ativas, através da determinação do perfil fitoquímico, isolamento e identificação de compostos, estudos farmacológicos e toxicológicos de determinadas plantas nativas do cerrado brasileiro, cujas informações etnofarmacológicas as relacionaram com atividade antiúlcera.

Um dos objetivos desse trabalho foi avaliar as plantas *D. nitida* e *D. elliptica* quanto ao seu potencial de indução de danos ao DNA. Para tanto, foi utilizado o teste de mutação gênica reversa com *Salmonella typhimurium* (teste de Ames), que é um teste rápido amplamente aceito para identificar uma grande variedade de compostos químicos capazes de induzir danos no material genético, levando ao aparecimento de mutações gênicas (Mortelmans e Zeiger, 2000). Foram utilizadas as linhagens TA98, TA97a, TA100 e TA102 de *S. typhimurium*, capazes de promover uma triagem abrangente de diferentes compostos primários e secundários, com vários mecanismos de ação (Chung et al., 2005).

Nos ensaios com *Salmonella*, o extrato metanólico de *D. nitida* induziu mutações na linhagem TA98, em ausência e presença de metabolização (-/+ S9), e na linhagem TA97a, sem ativação metabólica (- S9). O extrato hidroalcoólico também induziu mutações na

linhagem TA98 (+ S9), porém apresentou valores de RM menores que os observados com o extrato metanólico.

A determinação dos perfis fitoquímicos das plantas foi realizada, de maneira mais detalhada, com os extratos metanólicos, uma vez que esses extratos forneceram os melhores resultados em ensaios biológicos, realizados por outros grupos de pesquisa deste projeto. Segundo a literatura, o metanol parece ser realmente um dos melhores solventes empregados na obtenção de extratos de plantas, por extrair maior quantidade de compostos (Calixto et al., 2004). A análise fitoquímica do extrato metanólico das folhas de *D. nitida* detectou a presença de taninos condensados, ácidos fenólicos e flavonóides.

A fração acetato de etila do extrato metanólico de *D. nitida* foi mutagênica para as linhagens TA98 (-/+ S9) e TA97a (- S9), enquanto a fração aquosa obtida do mesmo extrato evidenciou apenas indícios de mutagenicidade na linhagem TA97a (-/+ S9). A análise por CCD mostrou que os flavonóides e derivados de ácidos fenólicos ficaram concentrados na fração acetato de etila, enquanto os taninos e açúcares livres permaneceram na fração aquosa.

Flavonóides representam uma classe de compostos naturais presentes em vegetais. Estruturalmente, estes compostos são polifenóis com dois anéis aromáticos e um anel heterocíclico, que podem ser divididos em várias subclasses de acordo com o grau de oxidação do anel heterocíclico (Hertog et al., 1993; Rimm et al., 1996). A literatura reporta que, sob determinadas condições, algumas classes de flavonóides são capazes de desempenhar atividade mutagênica e genotóxica, em células procarióticas e eucarióticas (Duarte-Silva et al., 1997a, 1997b, 1996a, 1996b, MacGregor e Jurd, 1978, Gaspar et al., 1994, Muller et al., 1991).

Sendo assim, os flavonóides apresentam-se como os principais responsáveis pela mutagenicidade induzida nos extratos metanólico, hidroalcoólico e na fração acetato de etila de *D. nitida*. Essa classe de metabólitos secundários vegetais tem solubilidade reduzida em água, assim, a adição desse solvente ao extrato hidroalcoólico, provavelmente, reduziu a quantidade de flavonóides extraídos, o que pode ser responsável pela redução do efeito mutagênico nesse extrato (menores valores de RM). A baixa solubilidade dos flavonóides em água também explica o efeito mutagênico positivo da fração acetato de etila, onde ficaram concentrados os flavonóides, quando comparada à fração aquosa, que apresentou apenas indícios de mutagenicidade.

Além disso, a utilização de água como solvente favorece a extração de taninos condensados. Taninos são compostos fenólicos solúveis em água, que têm peso molecular entre 500 e 3000 Daltons. Eles podem ser classificados em taninos hidrolisáveis e taninos condensados. Taninos condensados ou proantocianidinas são os produtos polimerizados de flavan-3-óis e flavan-3,4-dióis ou uma mistura dos dois. Os polímeros, também referidos como “flavolans” são popularmente chamados de taninos condensados (Chung et al., 1998). Acredita-se que os taninos pertencem a uma classe de compostos com atividade protetora contra efeitos genotóxicos. (Huang et al., 1985; Mukhtar et al., 1988; Shimoï et al., 1985). Fujii et al. (2007) avaliaram o potencial do Oligonol[®] (um produto fenólico otimizado que contém monômeros do tipo catequinas e pequenos oligômeros de proantocianidinas) na indução de mutações gênicas no teste de mutação reversa, usando as linhagens TA98, TA100, TA104, TA1535 e TA1538 de *Salmonella typhimurium* e a linhagem WP2uvrA de *Escherichia coli*, e observaram que o oligonol não foi mutagênico nas linhagens testadas.

Nessas condições, o potencial mutagênico menos pronunciado do extrato hidroalcoólico e a indução de apenas indícios de mutagenicidade pela fração aquosa do

extrato metanólico de *D. nitida* podem também ser explicadas pela maior concentração de taninos condensados presente nessas preparações.

A avaliação da atividade mutagênica dos extratos obtidos a partir das folhas de *D. elliptica* também foi realizada. Em ausência de ativação metabólica, os extratos etanólico e clorofórmico apresentaram apenas indícios de mutagenicidade na linhagem TA97a. Os extratos metanólico, etanólico e clorofórmico induziram mutações na linhagem TA98, em experimentos realizados com metabolização, sendo que o extrato clorofórmico ainda mostrou sinais de mutagenicidade na linhagem TA102. A análise fitoquímica do extrato metanólico das folhas da planta *D. elliptica* também revelou a presença de taninos condensados, ácidos fenólicos e flavonóides, com maior concentração de taninos condensados nesta espécie. O extrato etanólico apresentou o mesmo perfil fitoquímico. O extrato clorofórmico foi submetido apenas a uma triagem fitoquímica parcial, revelando a presença de terpenos.

A presença de flavonóides nos extratos metanólico e etanólico pode explicar a atividade mutagênica apresentada pelos mesmos, enquanto os terpenos podem ser os responsáveis pela mutagenicidade induzida pelo extrato clorofórmico.

Partenina, uma lactona sesquiterpênica típica, é o principal componente bioativo de *Parthenium hysterophorus* L. (Asteraceae), uma erva tradicional cubana (Roig et al., 1988). Ramos et al. (2002) avaliaram o potencial mutagênico do partenina, através de ensaios de mutação gênica reversa com as linhagens TA1535, TA1537, TA98, TA100 e TA102 de *Salmonella typhimurium*, na ausência e presença de metabolização, e observaram um aumento limitado na frequência de reversão em TA102, de maneira dose-dependente, nas três primeiras doses testadas, e que foi acentuado na presença de metabolização.

As frações aquosa e acetato de etila, obtidas do extrato metanólico de *D. elliptica*, induziram indícios de mutagenicidade nas linhagens TA97a e TA98, em ausência e presença de ativação metabólica. A análise por CCD mostrou que os flavonóides e derivados de ácido gálico ficaram concentrados na fração acetato de etila, enquanto os taninos e açúcares livres permaneceram na fração aquosa.

A maior concentração de taninos condensados em *D. elliptica* pode explicar a ausência de resposta mutagênica positiva das frações aquosa e acetato de etila obtidas do extrato metanólico dessa planta. Embora esses compostos fiquem predominantemente retidos na fração aquosa, uma quantidade residual ainda pode ser encontrada na fração acetato de etila.

Os extratos metanólicos de *D. nitida* e *D. elliptica* foram utilizados na identificação dos metabólitos secundários dessas espécies, revelando a presença de ácido gálico, rutina, miricetina-3-*O*- α -rhamnosídeo, quercetina-3-*O*- β -galactosídeo, quercetina-3-*O*- α -arabinosídeo, quercetina-3-*O*- α -rhamnosídeo, miricetina e quercetina, em *D. elliptica*, e ácido gálico, rutina, miricetina-3-*O*- α -rhamnosídeo, quercetina-3-*O*- α -rhamnosídeo, miricetina e quercetina, em *D. nitida*.

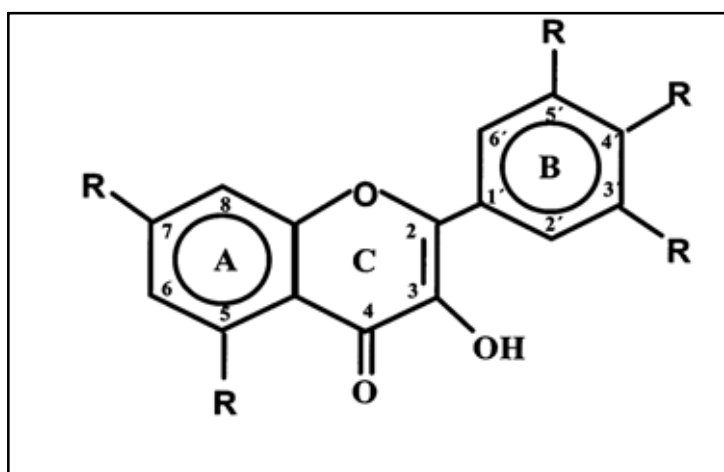


Figura 23: Estrutura geral dos flavonóides. Retirada de Duarte-Silva et al. (2000).

Quercetina, miricetina e seus derivados são flavonóis, que constituem a subclasse mais abundante de flavonóides e têm a estrutura geral representada na figura 23 (Hertog et al., 1993, Rimm et al., 1996).

As propriedades mutagênicas dos flavonóis têm sido demonstradas em diversos testes de mutagenicidade realizados com bactérias e mamíferos, e relaciona-se com suas propriedades químicas de conversão a quinonas/quinonas metídicas. A literatura relata que as exigências estruturais para a atividade mutagênica dos flavonóides incluem, em sua estrutura fundamental, uma hidroxila livre na posição 3, uma dupla ligação entre as posições 2,3 e um grupo ceto na posição 4 (MacGregor e Jurd, 1978).

Baseado nessas características, uma via metabólica de ativação dos flavonóides que origine espécies reativas com o DNA foi proposta. Para a quercetina, essa via inclui oxidação enzimática ou química, formando uma quercetina *orto*-quinona, seguida por uma isomerização da *orto*-quinona a quinonas metídicas (figura 24) (Middleton e Kandaswami, 1994, MacGregor e Jurd, 1978, Brown, 1980, Boersma et al., 2000). Sugere-se que essas quinonas metídicas são intermediários reativos que atuam como agentes alquilantes, levando à formação de adutos no DNA (Rietjens et al., 2005). Esses adutos podem ser estáveis por tempo suficiente para permanecerem nas células durante seu ciclo de replicação, levando à ocorrência de mutações (Westendorf et al., 2007).

Com base no exposto e nos resultados observados, pode-se concluir que os flavonóis presentes nas folhas de *D. nitida* e *D. elliptica* são os compostos responsáveis pelas mutações induzidas, nas linhagens de *Salmonella*, pelos extratos metanólico e hidroalcoólico de *D. nitida*, metanólico e etanólico de *D. elliptica* e pela fração acetato

de etila de *D. nitida* e, de acordo com as linhagens mutadas, esses compostos induzem, basicamente, mutações do tipo deslocamento do quadro de leitura do DNA (*frameshift*).

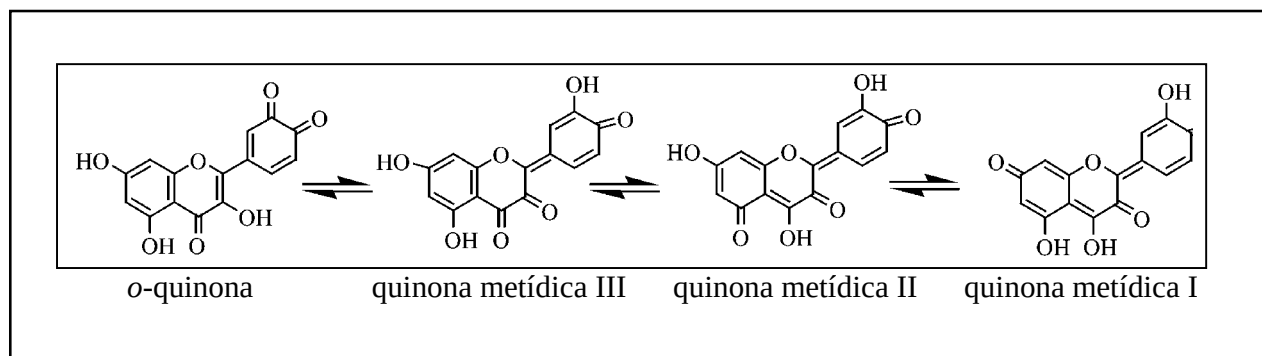


Figura 24. Isomerização da quercetina a quinona/quinona metídica. Retirada de Rietjens et al., 2005.

O potencial genotóxico das plantas *D. nitida* e *D. elliptica* também foi avaliado através de ensaios com DNA plasmidial pUC9.1. A indução de quebras no DNA altera a estrutura terciária superhelicoidizada do DNA plasmidial, modificando também a sua mobilidade eletroforética (Yoshino et al., 1999). Assim, o tratamento do DNA plasmidial com diferentes compostos, seguido de análise por eletroforese, permite verificar a ocorrência de quebras nessa macromolécula induzida por esses compostos.

Após tratamento do DNA plasmidial com as frações acetato de etila de *D. nitida* e *D. elliptica*, observou-se que, à medida que as concentrações das frações utilizadas aumentaram, houve redução da conformação superhelicoidizada do DNA, sem, contudo, ocorrer aparecimento das conformações de DNA circular aberto e linear, que são indicativas de quebras.

Diversas situações experimentais foram desenvolvidas na tentativa de elucidar esses resultados. Inicialmente, o DNA plasmidial era tratado com apenas três concentrações das frações acetato de etila das plantas (0,5, 5,0 e 25,0 mg/mL) e observava-se a redução da concentração do DNA superhelicoidizado, sem aparecimento das bandas de DNA circular aberto e linear. Portanto, foram avaliadas outras concentrações menores, supondo-se que, nas concentrações de 0,5 e 5,0mg/mL, as frações não fossem capazes de induzir quebras significativas no DNA, e na concentração de 25,0 mg/mL, as quebras fossem tão pronunciadas, que o DNA estaria sendo degradado a pequenos fragmentos que inviabilizavam a visualização das conformações circular aberta e linear do DNA. Os ensaios passaram, então, a ser realizados nas concentrações de 0,5, 2,5, 5,0, 12,5, 17,5, 20,0 e 25,0 mg/mL das frações acetato de etila das plantas e continuou sendo observada a redução da concentração do DNA superhelicoidizado, sem aparecimento das conformações indicativas de quebras.

Após a obtenção das frações aquosa e acetato de etila dos extratos metanólico de *D. nitida* e *D. elliptica*, a análise por CCD dessas frações revelou que os taninos ficavam retidos na fração aquosa, enquanto os flavonóides permaneciam na fração acetato de etila. Todavia, sabe-se que há residual de flavonóides na fração aquosa, e de taninos na fração acetato de etila. Assim, foram analisadas as frações aquosas das plantas para verificar se os taninos residuais nas frações acetato de etila estavam sendo responsáveis pelos resultados observados (originalmente, as frações aquosa das plantas não seriam testadas nos ensaios com plasmídeo, porque já não haviam fornecido resposta positiva para mutagenicidade no teste de Ames). A análise indicou que, em nenhuma das concentrações testadas, as frações aquosas de *D. nitida* e *D. elliptica* induziam número significativo de quebras no DNA, e a concentração do DNA superhelicoidizado permanecia praticamente a mesma no controle

negativo e nos tratamentos, descartando, então, a hipótese levantada. Essa já era uma resposta esperada, pois como já foi mencionado, os taninos são considerados compostos com atividade protetora contra efeitos genotóxicos, todavia, podem ocorrer interações de sinergismo entre os diferentes compostos de uma mistura, ocasionando efeitos genotóxicos, como demonstrado por Santos et al. (2006).

Por fim, considerou-se a possibilidade de interação da mistura de flavonóides, presente nas frações acetato de etila das plantas, com brometo de etídeo, que é o corante do DNA. Nessa condição, o corante ficaria menos disponível, no gel, para intercalar-se ao DNA, tornando as bandas de DNA superhelicoidizado menos evidentes. A fim de confirmar tal suposição, foram realizados ensaios com excesso de brometo de etídeo (conforme descrito no item 4.5.5.) e verificou-se que deixou de haver redução da concentração da conformação superhelicoidizada do DNA à medida que as concentrações das frações aumentaram. Em excesso, há brometo de etídeo suficiente para interagir com a mistura de flavonóides das amostras e, também, intercalar-se ao DNA, corando-o.

Os flavonóides são compostos conhecidos por sua atividade antioxidante e essa capacidade é dependente, entre outros fatores, da habilidade desses compostos quelarem metais de transição (Barrieros et al., 2006). Supõe-se que, da mesma maneira, os flavonóides sejam capazes de quelar o bromo, presente na molécula do brometo de etídeo, explicando a interação entre esses compostos.

Também foram avaliadas nos ensaios com DNA plasmidial as substâncias quercetina, miricetina, quercetina-3-O- α -L-rhamnopiranosídeo (quercetrina), miricetina-3-O- α -L-rhamnopiranosídeo (miricetrina) e ácido gálico (figura 25), que foram isoladas de uma infusão das folhas de *D. elliptica*. As substâncias foram isoladas apenas de *D. elliptica* porque o conteúdo flavonoídico das duas espécies é muito semelhante, observando-se

apenas diferenças em termos quantitativos. Além disso, *D. elliptica* apresenta composição aparentemente mais concentrada no conteúdo de seus metabólitos secundários, quando comparada a *D. nitida*.

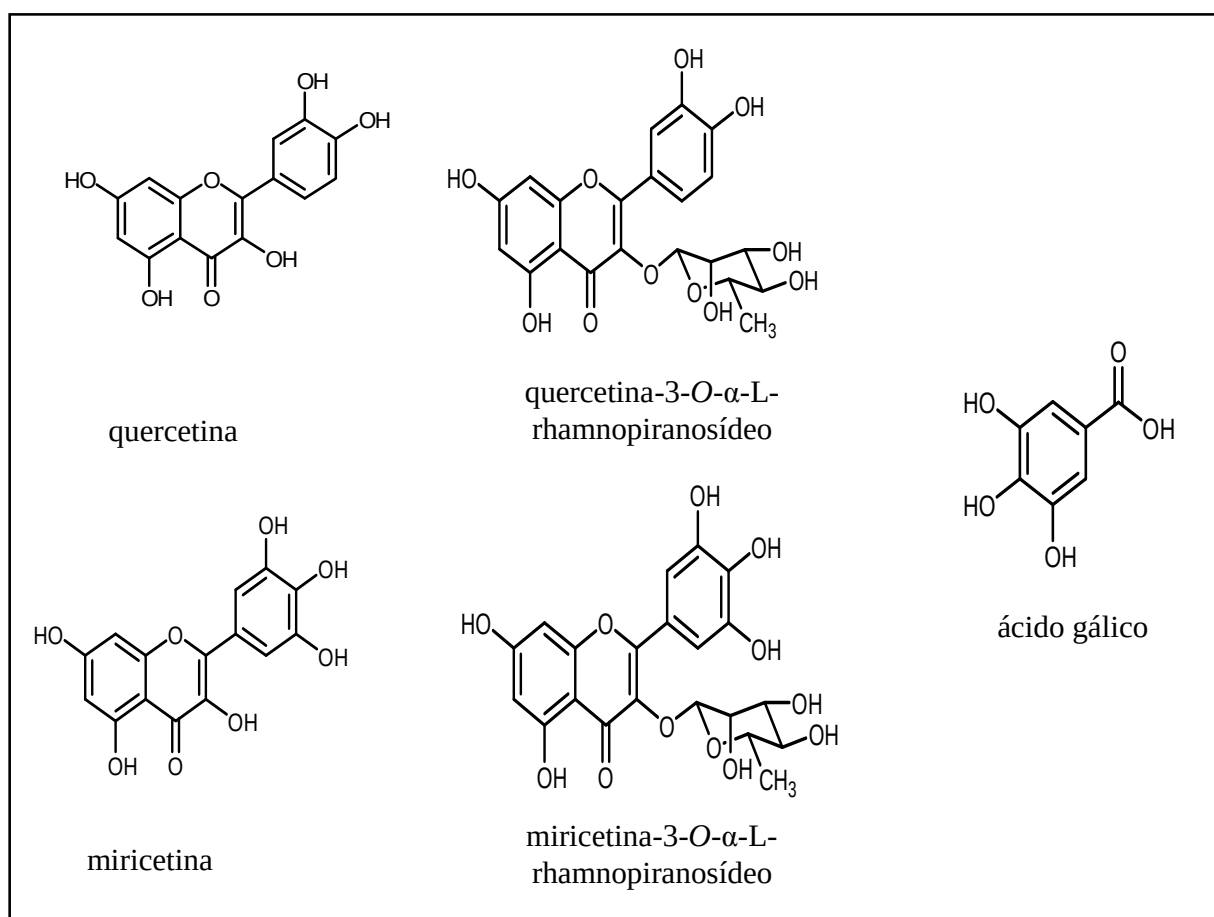


Figura 25: Substâncias isoladas da infusão das folhas de *D. elliptica*. Retirada de Rodrigues, 2007.

Embora tenham sido utilizados, basicamente, extratos alcoólicos e frações obtidas a partir de extratos metanólicos, nos ensaios com *Salmonella* e DNA plasmidial, foi utilizado o infuso das folhas de *D. elliptica* no isolamento dos compostos, pois o extrato metanólico apresenta maior concentração de taninos condensados e esses compostos interferem nas etapas de isolamento de substâncias puras (Rodrigues, 2007).

Após tratamento do plasmídeo pUC 9.1 com quercetina, miricetina, quercetina-3-O- α -L-rhamnopiranosídeo (quercetrina), miricetina-3-O- α -L-rhamnopiranosídeo (miricetrina) e ácido gálico, não foi observada a indução de quebras, em nenhuma das concentrações testadas, com nenhuma das substâncias. No entanto, a literatura relata que algumas classes de flavonóides são capazes de induzir danos no DNA e que esse processo é dependente de metais de transição, especificamente, o cobre (Duarte-Silva et al., 2000, Yoshino et al., 1999).

Sendo assim, foram realizados ensaios em que o plasmídeo pUC9.1 foi incubado com as substâncias puras isoladas de *D. elliptica*, na presença de sulfato de cobre II. Nessa ocasião, verificou-se que todas as substâncias testadas promoveram o surgimento das bandas de DNA circular aberto e DNA linear, que são indicativas de quebras em fita simples e na dupla fita do DNA.

Em valores de pH acima da neutralidade, os grupos hidroxila do anel B dos flavonóis podem ser deprotonados (Equação 1) (Jovanovic et al, 1994):



permitindo a auto-oxidação destes compostos, com concomitante produção de radicais superóxido e semiquinonas (Equação 2) (Hodnick et al., 1988, Canadá et al., 1990):



A reação do flavonol deprotonado com oxigênio (Equação 2) é lenta. Todavia, ela pode ser catalizada por íons cúpricos (Cu^{2+}), presentes no meio reacional (Equações 3 e 4) (Laughton, 1989). No organismo dos mamíferos, o cobre é transportado, utilizado e estocado ligado à proteína específica, ceruloplasmina (Welch, 2002):





O radical superóxido gerado desta maneira pode propagar a oxidação dos flavonóis (Metodiewa et al., 1999, Cadenas, 1995), como representado na Equação 5:



O peróxido de hidrogênio pode entrar nas células e, no núcleo, originar radicais hidroxila ($OH^{\cdot}$), onde íons cuprosos ligados ao DNA podem catalizar a reação (Equação 6) (Dobo e Eastmond, 1994, Tsuda, 1981).



O cobre desempenha papel essencial na formação dos radicais hidroxila e não pode ser substituído por ferro. Os danos ao DNA dependentes de cobre são atribuídos à ligação preferencial desse metal a seqüências poli G e GC nessa macromolécula (Sagripanti, 1989).

A estrutura eletrodensa do DNA torna-o um excelente alvo para o ataque por muitas espécies reativas de oxigênio, como os radicais superóxido, peróxido de hidrogênio e hidroxila. Um amplo espectro dessas lesões oxidativas *in vitro* e *in vivo* inclui quebra das fitas do DNA, como observado nos resultados apresentados, e modificação dos pares de bases, como demonstrado por Homma et al. (1994) e Toyokuni e Sagripanti (1996). Assim, a genotoxicidade dos flavonóis quercetina, miricetina, quercetina-3-O- α -L-rhamnopiranosídeo (quercetrina), miricetina-3-O- α -L-rhamnopiranosídeo (miricetrina) pode ser atribuída à sua auto-oxidação, com produção concomitante de espécies genotóxicas.

O menor número de quebras/genoma induzido por quercetina-3-O- α -L-rhamnopiranosídeo (quercetrina) pode ser atribuído à adição do açúcar na hidroxila da posição 3 do anel C, o que afeta o potencial de óxido-redução dos flavonóis e, conseqüentemente, sua capacidade de auto-oxidação (Hodnick et al., 1988).

O ácido gálico é um composto fenólico isolado das folhas de *D. elliptica*, que também induziu quebras nas fitas de DNA. Segundo Martínez et al. (2000), o mecanismo que descreve a genotoxicidade desses compostos também está relacionado a processos oxidativos.

A presença dos flavonóis, quercetina, miricetina, quercetina-3-O- α -L-rhamnopiranosídeo (quercetrina), miricetina-3-O- α -L-rhamnopiranosídeo (miricetrina), e dos derivados de ácidos fenólicos, como o ácido gálico, nas frações acetato de etila de *D. nitida* e *D. elliptica* pode explicar a indução de quebras no DNA por essas amostras, em experimentos realizados na presença de cobre. A quantidade residual desses compostos nas frações aquosa das plantas pode ter sido responsável pelas quebras no DNA provocadas por essas preparações, nas mesmas condições, uma vez que as quebras induzidas pelas frações aquosas foram menos pronunciadas que as quebras induzidas pelas frações acetato de etila das plantas, onde os compostos acima mencionados estão presentes em maior concentração.

O acúmulo de mutações está relacionando com o desenvolvimento de doenças degenerativas, envelhecimento, alterações genéticas nos descendentes e, principalmente, com grande parte dos tipos de cânceres (Cuzzocrea et al., 2001, Migliore e Coppedè, 2002).

O desenvolvimento de cânceres ocorre, muitas vezes, como consequência de mutações sucessivas e expansão do clone mutante. Mutações que inativam genes supressores de tumor, ativam proto-oncogenes e telomerasas, estimulam a proliferação e inibem a morte celular fornecem um grande estímulo na iniciação de um câncer (Hahn et al., 2002). Mutações do tipo substituição e deleção de bases são encontradas nesses genes, numa grande variedade de tipos de câncer (Greenblatt et al., 1994).

Apesar do exposto, os dados de mutagenicidade e genotoxicidade obtidos, não implicam, necessariamente, em riscos mutagênicos e genotóxicos a humanos. Em células

eucarióticas, o DNA nuclear é organizado na forma de nucleossomos, contendo histonas envolvendo o DNA, e, assim, é mais resistente a injúrias promovidas por radicais livres do que os danos oxidativos que ocorrem em DNA extraído. Essa menor suscetibilidade deve-se à estrutura nucleossômica, ao seqüestro de radicais livres por histonas e ao envolvimento das bases do DNA na estrutura da cromatina (Dizdaroglu et al., 1991, Sahu e Gray, 1997).

Além disso, muitas substâncias com atividade mutagênica não podem ser absorvidas, minimizando tal potencial dessas substâncias (Barros et al., 2005). Não obstante, grande parte das mutações é descoberta e eliminada por enzimas de reparo. A proporção de mutações que são retificadas por mecanismos fisiológicos é ainda desconhecida, e é dependente da constituição e do estado de saúde dos indivíduos (Havsteen, 2002).

Em síntese, os resultados positivos no teste de Ames e as quebras no DNA plasmidial induzidas pelos extratos e frações de *D. nitida* e *D. elliptica* sugerem que o uso indiscriminado e prolongado de preparações caseiras dessas plantas pode oferecer riscos à saúde. Estudos aprofundados, que avaliem as propriedades farmacocinéticas e a resposta mutagênica/genotóxica *in vivo*, são fundamentais para confirmar o potencial mutagênico e garantir a segurança do uso das plantas *D. nitida*, *D. elliptica* e de seus metabólitos secundários com fins terapêuticos.

6.2. Fitoestrogenicidade

A maioria das mulheres no período climatérico e pós-menopausa apresenta sintomas vasomotores e risco elevado de desenvolver osteoporose e doenças cardiovasculares, o que

ocorre devido à deficiência de hormônios ovarianos, especialmente os estrógenos (Harlow e Signorello, 2000).

Terapias de reposição hormonal, feitas com estrógenos exógenos para amenizar esses sintomas, não são bem aceitas entre as mulheres, pois têm sido relacionadas ao aumento do risco de câncer de mama (Beral, 2003) e doenças cardiovasculares (Hodis et al., 2003).

Sendo assim, muitos esforços têm sido direcionados à tentativa de descobrir uma terapia alternativa que ofereça riscos mínimos. Moduladores seletivos dos receptores de estrógenos (SERMs) são reconhecidos por sua capacidade de exercer efeitos estrogênicos e antiestrogênicos. Fitoestrógenos, compostos produzidos por uma ampla variedade de vegetais, parecem possuir essas características, e vêm sendo encarados como alternativa potencial à terapia de reposição hormonal (Delmas et al., 1997). Flavonóides, isoflavonóides, coumestanas e lignanas são metabólitos secundários vegetais reconhecidos como fitoestrógenos (Mazur et al., 1998).

Nessas condições, os flavonóides isolados das folhas de *D. elliptica* foram avaliados quanto ao seu potencial fitoestrogênico, através de ensaios de proliferação celular com células MCF-7 (ensaio E-Screen). Células MCF-7 de adenocarcinoma de mama humano são modelos bem reconhecidos de células responsivas a estrógenos (Soule et al., 1973) e o ensaio E-Screen tem sido caracterizado como um teste rápido e direto na detecção de compostos estrogênicos (Soto et al., 1995). Estrógenos naturais estimulam a proliferação celular de órgãos sexuais femininos (Hertz, 1985), assim, esse efeito proliferativo é adotado como método para determinar se um composto químico tem atividade estrogênica ou não, podendo diferenciar compostos agonistas, agonistas parciais ou inativos (Korach e McLachlan, 1995), comparando a proliferação celular obtida em concentrações variáveis da

substância em análise com aquelas observadas após exposição a controles positivos e negativos (Soto et al., 1992; Oh e Chung, 2004).

Inicialmente, foram realizados ensaios de citotoxicidade com as células MCF-7, com o objetivo de determinar as concentrações de quercetina, quercetina-3-O- α -L-rhamnopiranosídeo (quercetrina), miricetina e miricetina-3-O- α -L-rhamnopiranosídeo (miricetrina) que reduziriam a viabilidade celular. Esses ensaios foram realizados empregando a técnica da Sulforodamina B (Skehan et al. 1990, Rasmussen e Nielsen, 2002), corante que se liga a aminoácidos básicos das proteínas celulares e, por avaliação colorimétrica, fornece uma estimativa da massa protéica total, que é relacionada ao número de células vivas que foram fixadas. O método da sulforodamina B substituiu ensaios baseados em sais de tetrazólio (MTT), exibindo várias vantagens, dentre elas, melhor linearidade, maior sensibilidade, estabilidade do produto final, que não é sensível ao tempo de leitura, e baixo custo (Rubinstein et al., 1990, Keepers et al., 1991, Monks et al., 1991, Perez et al., 1993). As concentrações testadas (200 e 100 μ M) foram determinadas com base em dados da literatura, que considerou quercetina, na concentração de 100 μ M, não-citotóxica para células MCF-7 (Oh e Chung, 2004). Foram consideradas citotóxicas as concentrações das amostras que forneceram viabilidade celular inferior a 80% e, após 72 horas de incubação, a maioria das concentrações testadas, de todas as amostras, exibiram citotoxicidade para a linhagem MCF-7 utilizada nos ensaios, exceto quercetina-3-O- α -L-rhamnopiranosídeo (quercetrina) 100 μ M.. De acordo com os resultados obtidos nesses ensaios e informações da literatura (Breinholt e Larsen, 1998), foram determinadas as concentrações que foram utilizadas nos ensaios de proliferação (50 a 0,01 μ M).

Sabendo que estrógenos e compostos que os mimetizam são capazes de induzir a proliferação de células responsivas a estrógenos (Soto et al., 1992, 1995), é previsível que

essas células, quando cultivadas em meio carente de estrógenos, não se proliferem. Assim, foi feita a remoção de estrógenos endógenos do soro fetal bovino através de tratamento específico, e esse soro tratado foi utilizado para suplementar o meio de cultura, obtendo-se, então, um meio de cultura sem estrógenos (meio experimental), que foi utilizado como controle negativo dos ensaios de proliferação.

O efeito proliferativo do 17- β -estradiol e dos flavonóides testados foi determinado comparando-se o número de células obtido em cada um dos tratamentos com o número de células obtido no controle negativo, sendo que o número de células foi determinado através do ensaio colorimétrico da sulforodamina B (Skehan et al. 1990, Rasmussen e Nielsen, 2002).

De acordo com os resultados obtidos nos ensaios realizados, o 17- β -estradiol não apresentou efeito proliferativo pronunciado, quando comparado ao controle negativo, e essa foi uma resposta inesperada, uma vez que as células MCF-7 são reconhecidas por apresentarem receptores de estrógenos e serem responsivas a esses hormônios.

Entretanto, diversos estudos realizados demonstraram que há diferentes linhagens de células MCF-7, as quais apresentam diferentes respostas proliferativas quando expostas ao 17- β -estradiol (Villalobos et al., 1995). Essas diferenças podem ser ocasionadas por variações genótípicas (Graham et al., 1986) ou, ainda, por diferentes relações entre o número de receptores estrogênicos do tipo selvagem e do tipo variante (nos quais o RNAm contém uma deleção do éxon 5) (Klotz et al., 1995). Entre as diferentes linhagens, as células MCF-7/BUS apresentam o melhor perfil de resposta frente ao 17- β -estradiol (Villalobos et al., 1995).

Payne et al. (2000) investigaram o impacto de diferentes linhagens celulares no resultado dos ensaios de proliferação com células MCF-7, através de análise das curvas

dose-resposta fornecidas por três linhagens de células MCF-7 (BUS, UCL e SOP), quando expostas a diferentes concentrações de 17- β -estradiol, de acordo com o protocolo de Soto et al. (1995). Os resultados evidenciaram diferenças marcantes quanto ao efeito proliferativo do hormônio nas três linhagens celulares, sendo que a linhagem MCF-7/BUS produziu o maior efeito proliferativo, enquanto as variantes UCL e SOP induziram, apenas, pequenos aumentos no número de células. Esses pesquisadores ainda demonstraram que essas diferenças na resposta proliferativa são atribuídas a notáveis diferenças citogenéticas e que elas podem ser moduladas através de modificações nas condições de cultivo celular.

Diversas alterações no protocolo do ensaio E-Screen, originalmente descrito por Soto et al. (1992, 1995), foram testadas, tais como, aumento das concentrações de 17- β -estradiol, utilizadas no preparo das curvas hormonais (de 10^{-13} a 10^{-9} M para 10^{-9} a 10^{-5} M), redução na concentração de células semeadas (de 20 mil para 10 mil células/cavidade), com posterior aumento do tempo de cultura no meio de manutenção (meio completo) (de 24 para 48 horas) (Payne et al., 2000), realização dos ensaios de proliferação em placas de 96 poços (e outras modificações cabíveis, sugeridas por Rasmussen e Nielsen, 2002). Além das variações no protocolo, outras alternativas foram testadas, na tentativa de aprimorar a resposta celular obtida, por exemplo, redução do tempo de cultura em meio experimental (meio sem hormônios com 17- β -estradiol ou amostras), alteração da marca das placas de cultura (TPP – Techno Plastic Products, Switzerland, Nunc – Thermo Fisher Scientific, Corning - Corning Incorporated, USA) e uso de 17- β -estradiol proveniente de lotes diferentes. Todos esses fatores são citados na literatura como prováveis fontes de variações nas respostas proliferativas das células MCF-7 (Rasmussen e Nielsen, 2002).

Apesar das tentativas, nenhuma melhora no efeito proliferativo das células MCF-7 frente ao 17- β -estradiol pode ser observada, e os resultados permaneceram sempre

semelhante ao apresentado no item 5.3.2. Apesar disso, foram realizados ensaios de proliferação com os flavonóides isolados de *D. elliptica*, utilizando o protocolo descrito por Rasmussen e Nielsen (2002), devido às simplificações nele apresentadas.

Os dados obtidos nesses ensaios também mostraram que quercetina, quercetina-3-*O*- α -L-rhamnopiranosídeo (quercetrina), miricetina e miricetina-3-*O*- α -L-rhamnopiranosídeo (miricetrina) não foram capazes de estimular a frequência de proliferação celular, quando comparadas à proliferação celular obtida com o controle negativo, em nenhuma das concentrações testadas.

Esses resultados são incompatíveis com a literatura, que relata que vários compostos da classe dos flavonóides são capazes de interagir com receptores de estrógenos e desempenhar atividade estrogênica (Oh e Chung, 2004), sendo que essa atividade é mais acentuada em compostos que apresentam um grupo hidroxila, na posição 4' do anel B, em orientação *para* (Breinholt e Larsen, 1998).

Segundo Pratt e Pollak (1993), em linhagens celulares de tumor de mama positivas para receptores de estrógenos, insulina ou fatores de crescimento semelhantes a insulina (IGFs), em determinadas concentrações, são capazes de interagir com receptores de IGF tipo I, promovendo efeitos mitogênicos, que são mais pronunciados na presença de estrógenos. Não obstante, Hamelers et al. (2003) verificaram que a resposta proliferativa induzida por 17- β -estradiol, em diferentes linhagens de células MCF-7 (S, ATCC, NIK), é dependente da ativação de receptores de IGF tipo I. Nessas condições, o uso de meio de cultura suplementado com insulina (Pratt e Pollak, 1993, Osborne et al., 1987) poderia ter promovido a resposta proliferativa das células MCF-7/ATCC, quando expostas ao 17- β -estradiol ou a compostos estrogênio miméticos, nos ensaios de proliferação celular.

Com base no exposto e nos resultados obtidos, não foi possível determinar o potencial fitoestrogênico de quercetina, quercetina-3-O- α -L-rhamnopiranosídeo (quercetrina), miricetina e miricetina-3-O- α -L-rhamnopiranosídeo (miricetrina), uma vez que, nas condições empregadas nos cultivos e ensaios, a linhagem MCF-7/ATCC não apresentou resposta proliferativa frente ao 17- β -estradiol, e, nessas condições, não foi possível identificar, entre os flavonóides testados, compostos capazes de mimetizar a ação desse hormônio.

7. Conclusões

*“Não tenho um caminho novo. O que eu tenho de novo é
um jeito de caminhar”.*

Thiago de Melo

Os resultados apresentados no trabalho permitem concluir que:

- O extrato metanólico de *D. nitida* apresentou atividade mutagênica nas linhagens TA98 e TA97a, e o extrato hidroalcoólico, apenas na linhagem TA98, sendo que a adição de água neste último reduziu a quantidade de flavonóides extraídos e, conseqüentemente, reduziu seu potencial mutagênico;
- Os extratos metanólico, etanólico e clorofórmico de *D. elliptica* evidenciaram potencial mutagênico na linhagem TA98, somente em ensaios realizados com ativação metabólica; em ausência de metabolização, os extratos etanólico e clorofórmico induziram indícios de mutagenicidade na linhagem TA97a;
- A fração acetato de etila do extrato metanólico de *D. nitida* induziu mutações na linhagem TA98 e TA97a, enquanto a fração aquosa desse extrato evidenciou apenas sinais de mutagenicidade na linhagem TA97a, o que se deve à maior concentração de flavonóides, na fração acetato, e de taninos condensados, na fração aquosa;
- As frações aquosa e acetato de etila do extrato metanólico de *D. elliptica* mostraram apenas fortes indícios de mutagenicidade, resposta que pode ser atribuída à maior concentração de taninos condensados nesta espécie;
- As frações aquosa e acetato de etila dos extratos metanólicos de *D. nitida* e *D. elliptica*, bem como as substâncias quercetina, miricetina quercetina-3-O- α -L-rhamnopiranosídeo (quercetrina), miricetina-3-O- α -L-rhamnopiranosídeo (miricetrina) e ácido gálico, isoladas das folhas de *D. elliptica*, não induziram quebras nas fitas do DNA plasmidial;
- Na presença de cobre, quercetina, miricetina, quercetina-3-O- α -L-rhamnopiranosídeo (quercetrina), miricetina-3-O- α -L-rhamnopiranosídeo (miricetrina) e ácido gálico

induziram quebras nas fitas do plasmídeo pUC9.1, uma vez que esse metal de transição favorece a auto-oxidação desses compostos, com conseqüente produção de radicais genotóxicos; as frações aquosa e acetato de etila de *D. nitida* e *D. elliptica* também promoveram quebras nas fitas do DNA, na presença de cobre;

- O potencial fitoestrogênico dos flavonóides quercetina, quercetina-3-O- α -L-rhamnopiranosídeo (quercetrina), miricetina, miricetina-3-O- α -L-rhamnopiranosídeo (miricetrina) não pode ser determinado, devido à ausência de responsividade a estrógenos apresentada pela linhagem de células MCF-7/ATCC, nas condições de cultivo e ensaio utilizadas.

8. Referências Bibliográficas

*“O vírus do amor ao livro é incurável, e eu procuro inocular
esse vírus no maior número possível de pessoas”.
José Mindlin*

Addae-Mensah, I. Towards a Rational Scientific Basis for Herbal Medicine - a Phytochemist's Two-decade Contribution. *Ghana University Press Accra*. 1992.

Adlercreutz, H. Phyto-oestrogens and cancer. *The Lancet Oncology*. V.3. p.364–373, 2002.

Aires, M.M., Favareto, A.L.V., Bianco, A.C., Carvalho, A.C.C. de, Cassola, A.C., Timoni, C., et al. *Fisiologia*. Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro. 1999.

Amarquaye, A., Che, C.T., Bejar, E., Malone, M.H., Fong, H.H.S. A new glycolipid from *Byrsonima crassifolia*. *Planta Medica*. V.60. p.85–86, 1994.

Ames, B.N., Shigenaga, M.K., Hagen, T.M. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America*. V. 90. p.7915–7922, 1993.

Bae, E.A., Han, M.J., Choo, M.K., Park, S.Y., Kim, D.H. Metabolism of 20(S)- and 20(R)-ginsenoside R-g3 by human intestinal bacteria and its relation to in vitro biological activities. *Biological Pharmaceutical Bulletin*. V.25. p.58–63, 2002.

Barreiros A. L. B. S., David, J. M. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Química Nova*. V. 29(1). p. 113-123, 2006.

Barrón-González, A., Arias-Martínez, J., Castro-Romero, I. Antiestrógenos: mecanismo de acción y aplicaciones clínicas. *Salud pública de México*. V. 43. p.577-584, 2001.

Barros, S., Ropke, C.D., Sawada, T.C.H., Da Silva, V.V., Pereira, S.M.M., De Moraes, S.B. Assessment of acute and subchronic oral toxicity of ethanolic extract of *Pothomorphe umbellata* L Miq (Pariparoba). *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. V.41. p. 53–61, 2005.

Beck, V., Rohr, U., Jungbauer, A. Phytoestrogens derived from red clover: an alternative to estrogen replacement therapy. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. V.94. p.499–518, 2005.

Benassayag, C., Perrot-Appianat, M., Ferre, F. Phytoestrogens as modulators of steroid action in target cells. *Journal of Chromatography*. V.777. p.233-248, 2002.

Beral, V. Breast cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study. *Lancet*. V.362. p.419-27, 2003.

Beral, V., Banks, E., Reeves, G., Appleby, P. Use of HRT and the subsequent risk of cancer. *Journal of Epidemiology and Biostatistics*. V.4. p.191–210, 1999.

Berthois, Y., Katzenellenbogen, J., Katzenellenbogen, B. Phenol red in tissue culture media is a weak oestrogen: implications concerning the study of oestrogen-responsive cells in

culture. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*. V.83. p.2496-2500, 1986.

Bliley, R. Food Quality Protection Act of 1996. 104th Congress, 2nd session. Report 104-669, part 2. p. 1-89, 1996.

Boersma, M.G., Vervoort, J., Szymusiak, H., Lemanska, K., Tyrakowska, B., Cenas, N., Segura-Aguilar, J., Rietjens, I.M.C.M. Regioselectivity and reversibility of the glutathione conjugation of quercetin quinone methide, *Chemical Research in Toxicology*. V.13. p. 185-191, 2000.

Boué, S.M., Wiese, T.E., Nehls, S., Burow, M.E., Elliott, E., Carter-Wientjes, C.H., Shih, B.Y., McLachlan, J.A. Cleveland, T.E. Evaluation of the estrogenic effects of legume extracts containing phytoestrogens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. V.51. p.2193-2199, 2003.

Breinholt, V., Larsen, J.C. Detection of weak estrogenic flavonoids using a recombinant yeast strain and a modified MCF7 cell proliferation assay. *Chemical Research in Toxicology*. V. 11. p.622-629, 1998.

Brown, J.P. A review of the genetic effects of naturally occurring flavonoids, anthraquinones and related compounds. *Mutation Research*. V.75. p.243-277, 1980.

Brzezinski, A., Debi, A. Phytoestrogens: the 'natural' selective estrogen receptor modulators. *European Journal of Obstetrics, Gynecology and Reproductive Biology*. V.85. p.47-51, 1999.

Cadenas, E. Antioxidant and pro-oxidant functions of DT-diaphorase in quinone metabolism. *Biochemical Pharmacology*. V. 49. p.127-140, 1995.

Calixto, J.B., Campos, M.M., Otuki, M.F., SANTOS, A.R.S. Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part II. Modulation of pro-inflammatory cytokines, chemokines, adhesion molecules. *Planta Medica*. V. 70, p. 93-103, 2004.

Canadá, A.T., Giannella, E., Nguyen, T.D., Mason, R.P. The production of reactive oxygen species by dietary flavonols. *Free Radical Biology and Medicine*. V.9. p.441- 449, 1990.

Cardoso, C.R.P., Cólus, I.M., 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.

Cerqueira, F.M., Medeiros, M.H.G. de, Augusto, O. Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. *Química Nova*. V. 30, 2007.

Chung, K.T., Wong, T. Y., Wei, C. I., Huang, Y. W. and Lin, Y. Tannins and human health: a review. *CRC Critical Reviews in Food and Nutrition*. V.38. p. 421-464, 1998.

Chung, Y.C., Chien, C.T., Teng, K.Y., Chou, S.T. Antioxidative and mutagenic properties of *Zanthoxylum ailanthoides* Sieb & zucc. *Food and Chemical Toxicology*. V. 43, p. 247-252, 2005.

Cordell, G.A. Changing strategies in natural products chemistry. *Phytochemistry*. V.40. p. 1585–1612, 1995.

Cuzzocrea, S., Riley, P.D., Caputi, P.A., Salvemini, D. Antioxidant therapy: a new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia/reperfusion injury. *Pharmacology Review*. V. 53. p.135–159, 2001.

David, J.M., Cruz, F.G., Guedes, M.L.S., Chavez, J.P. Flavonol glycosides from *Davilla flexuosa*. *Journal of Brazilian Chemical Society*. V.7. p. 115-118, 1996.

De Sá Ferreira, I.C.F., Ferrão Vargas, V.M. Mutagenicity of medicinal plant extracts in Salmonella/microsome assay. *PhytotherapyResearch*. V.13. p. 397–400, 1999.

Dearfield, K.L., Cimino, M.C., McCarroll, N.E., Mauer, I., Valcovic, L.R. Genotoxicity risk assessment: a proposed classification strategy. *Mutation Research*. V.521. p.121–135, 2002.

Delaney, B., Phillips, K., Vasquez, C., Wilson, A. Cox, D. Wang, H-B., Manthey, J. Genetic toxicity of a standardized mixture of citrus polymethoxylated flavones. *Food and Chemical Toxicology*. V. 40. p.617-624, 2002.

Delmas, P.D., Bjarnason, N.H., Mitlak, B.H., Ravoux, A.C., Shah, A.S., Huster, W.J., Draper, M., Christiansen, C. Effects of raloxifene on bone mineral density, serum cholesterol concentrations, and uterine endometrium in postmenopausalwomen. *New England Journal of Medicine*. V.337. p.1641–1647, 1997.

Dias, F. L., Takahashi, C. S., Sakamoto-Hojo, E.T., Vichnewski, W., Sarti,S.J. Genotoxicity of the natural Cercaricides “Sucupira” oil and eremanthine in mammalian cells in vitro and in vivo. *Environmental Molecular Mutagenesis*. V.26. p.338–344, 1995.

Dizdaroglu, M., Rao, G., Halliwell, B., Gajewski, E. Damage to the DNA in mammalian chromatin by hydrogen peroxide in the presence of ferric and cupric ions. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. V.285. p.317–324, 1991.

Dobo, K.L., Eastmond, D. Role of oxygen radicals in the chromosomal loss and breakage induced by the quinone-forming compound, hydroquinone and *tert*-butylhydroquinone, *Environmental and Molecular Mutagenesis*. V.24. p. 293–300, 1994.

Duarte Silva, I., Gaspar, J., Gomes da Costa, B., Rodrigues, A.S., Laires, A., Rueff, J. Chemical features of flavonols affecting their genotoxicity. Potential implications in their use as therapeutical agents. *Chemico-Biological interactions*. V.124. p.29-51, 2000.

Duarte Silva, I., Rodrigues, A.S., Gaspar, J., Maia, R., Laires, A., Rueff, J. Involvement of rat cytochrome 1A1 in the biotransformation of kaempferol to quercetin: Relevance to the genotoxicity of kaempferol. *Mutagenesis*. V.12. p.383–390, 1997a.

Duarte Silva, I., Rodrigues, A.S., Gaspar, J., Laires, A., Rueff, J. Metabolism of galangin by rat cytochromes P450: Relevance to the genotoxicity of galangin, *Mutation Research*. V. 343. p. 247–257, 1997b.

Duarte Silva, I., Gaspar, J., Rodrigues, A.S., Gomes da Costa, B., Laires, A., Rueff, J. Mechanisms of myricetin mutagenicity in V79 cells: Involvement of radicalar species. *Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis*. V.16. p.253–268, 1996a.

Duarte Silva, I., Rodrigues, A., Gaspar, J., Maia, R., Laires, A., Rueff, J. Mutagenicity of kaempferol in V79 cells: The role of cytochromes P450. *Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis*. V.16. p. 229–241, 1996b.

Fabricant, T.S.; Farnsworth, N.R.. The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. *Environmental Health Perspective*. V.109. p.69-75, 2001.

Fang, H., Tong, W., Perkins, R., Soto, A.M., Prechtel, N.V., Sheehan, D.M. Quantitative comparisons of *in vitro* assays for estrogenic activities. *Environmental Health Perspectives*. V.108. p. 723-729, 2000.

Fornelli, F., Leone, A., Verdesca, I., Minervini, F., Zacheo, G. The influence of lycopene on the proliferation of human breast cell line (MCF-7). *Toxicology in Vitro*. V.21, p.217-223, 2007.

Fujii, H., Sun, B., Nishioka, H., Hirose, A., Aruoma, O.I. Evaluation of the safety and toxicity of the oligomerized polyphenol Oligonol. *Food and Chemical Toxicology*. V. 45. p.378-387, 2007

Gaspar, J., Rodrigues, A., Laires, A., Silva, F., Costa, S., Monteiro, M.J., Monteiro, C., Rueff, J. On the mechanisms of genotoxicity and metabolism of quercetin. *Mutagenesis*. V.9. p. 445–449, 1994.

Geller, S.E., Kronenberg, F. Toward optimal health: the experts discuss the use of botanicals by women. *Journal of Women's Health*. V.12, p.847–852, 2003.

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

Goldman, L. EPA-led endocrine modulator task forceplanned to conduct screening test of chemicals. *Pesticide and Toxic Chemical News*. p. 3-7, 1996.

Graham, K., Trent, J., Osborne, C., McGrath, C.M., Minden e Buick, R. The use of restriction fragment polymorphism to identify the cell line MCF-7. *Breast Cancer Research and Treatment*. V.8, p.29-34, 1986.

Greenblatt, M.S., Bennett, W.P., Hollstein, M., Harris, C.C. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Research*. V.54. p.4855–4878, 1994.

Guedes, A.P., Cardoso, V.N., Mattos, J.C. P. de, Dantas, F. J. S., Matos, V.C., Silva, J.C.F., Bezerra, R.J.A.C., Caldeira-de-Araújo, A. Cytotoxic and genotoxic effects induced by stannous chloride associated to nuclear medicine kits. *Nuclear Medicine and Biology*. V.33. p.915-921, 2006.

Gurni,A.A., Kubtzki,K. Flavonoid chemistry and systematics of the Dilleniaceae. *Biochemical Systematics and Ecology*. V.9. p.109-114, 1981.

Gustafsson, J.A. Estrogen receptor beta: a new dimension in estrogen mechanism of action. *The Journal of Endocrinology*. V.163. p.379–383, 1999.

Hahn, W.C., Weinberg, R.A. Rules for making human tumor cells. *New England Journal of Medicine*. V.347. p.1593–603, 2002.

Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., Cross, C.E. Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now? *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. V. 119.p.598–620, 1992.

Halliwell, B. How to characterise a biological antioxidant. *Free Radical Research*. V.9. p.1–32, 1990.

Hamburger, M., Hostetmann, K. Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine. *Phytochemistry*. V. 30 (12). p.3864–3884, 1991.

Hamelers, I.H.L., van Schaik, R.F.M.A, Sussenbach, J.S., Steenbergh, P.H. 17- β -estradiol responsiveness of MCF-7 laboratory strains is dependent on an autocrine signal activating the IGF type I receptor. *Cancer Cell International*. V. 3. p.10, 2003.

Harlow, B.L., Signorello, L.B. Factors associated with early menopause. *Maturitas*. V.35, p.3–9, 2000.

Havsteen, B.H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology & Therapeutics*. V.96. p.67-202, 2002.

Hertog, M.G.L., Feskens, E.J.M., Hollman, P.C.H., Katan, M.B., Kromhout, D. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: The Zutphen elderly study, *Lancet* . V.342. p. 1007–1011, 1993.

Hertz, R. The estrogen problem - retrospect and prospect. In *Estrogens in the Environment II - Influences on Development* (Edited by J.A. McLachlan). p.1-11. Elsevier, New York, 1985.

Hodis, H. N., Mack, W. J., Azen, S. P., Lobo, R. A., Shoupe, D., Mahrer, P. R., Faxon, D.P., Cashin-Hemphill, L., Sanmarco, M. E., French, W. J., Shook, T. L., Gaarder, T. D., Mehra, A. O., Rabbani, R., Sevanian, A., Shil, A. B., Torres, M., Vogelbach, K. H., Selzer, R.H. *New England Journal of Medicine*. V. 349. p. 535-45, 2003.

Hodnick, W.F., Milosavljevic, B., Nelson, J.H., Pardini, R.S. Electrochemistry of flavonoids: Relationships between redox potentials, inhibition of mitochondrial respiration and production of oxygen radicals by flavonoids. *Biochemical Pharmacology*. V. 37 p.2607–2611, 1988.

Homma, Y., Tsunoda, M., Kasai, H. Evidence for the accumulation of oxidative stress during cellular ageing of human diploid fibroblasts. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. V. 203. p. 1063-1068, 1994.

Huang, M. T., Chang, R. L., Wood, A. W., Newmark, H. L., Sayer, J. M., Yagi, Y., Jerina, D. M., Conney, A. M. Inhibition of the mutagenicity of the bay region diol epoxides of polycyclic hydrocarbons by tannic acid, hydroxylated anthraquinones and hydroxylated cinnamic acid derivatives. *Carcinogenesis*. V. 6. p. 237-242, 1985.

Jones, P.A., Baker, V.A., Irwin, A.J.E., Earl, L.K. Interpretation of the *in vitro* proliferation response of MCF-7 cells to potential oestrogens and non-oestrogenic substances. *Toxicology in Vitro*. V.12. p. 373-382, 1998.

Jovanovic, S.V., Steenken, S., Tasic, M., Marjanovic, B., Simic, M.G. Flavonoids as antioxidants. *Journal of American Chemical Society*. V.116. p. 4846–4851, 1994.

Kamatenesi-Mugisha, M., Oryem-Origa, H. Traditional herbal remedies used in the management of sexual impotence and erectile dysfunction in western Uganda. *African Health Sciences*. V.5. p. 40–49, 2005.

Keepers, Y.P., Pizao, P.E., Peters, G.J., van Ark-Otte, J., Winograd, B., Pinedo, H.M. Comparison of the sulforhodamine B protein and tetrazolium (MTT) assays for *in vitro* chemosensitivity testing. *European Journal of Cancer*. V. 27. p.897, 1991.

Kier, L.D., Brusick, D.J., Auletta, A.E., Von Halle, E.S., Simmon, V.F., Brown, M.M., Dunkel, V.C., McCann, J., Zeiger, K. E. *Mutation Research* V.492. p.29–38, 2001.

Klinge, C.M. Estrogen receptor interaction with co-activators and co-repressors. *Steroids*. V.65. p.227–251, 2000.

Klotz, D.M., Castles, C.G., Fuqua, S.A.W., Spriggs, L.L., Hill, S.M. Differential expression of wild-type and variant ER mRNAs by stocks of MCF-7 breast cancer cells may account

for differences in estrogen responsiveness. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. V.210. p.609-615, 1995.

Konan, N.A., Bacchi, E. M., Lincopan, N., Varela, S.D., Varanda, E.A. Acute, subacute toxicity and genotoxic effect of a hydroethanolic extract of the cashew (*Anacardium occidentale* L.). *Journal of Ethnopharmacology*. V.110. p.30-38, 2007.

Korach, K.S., McLachlan, J.A. Techniques for detection of estrogenicity. *Environmental Health Perspectives*. V. 103. p.5-8, 1995.

Kuiper, G.G., Carlsson, B., Grandien, K., Enmark, E., Haggblad, J., Nilsson, S., Gustafsson, J.A. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors {alpha} and {beta}. *Endocrinology*. V.138. p.863–870, 1997.

Kuiper, G.G., Enmark, E., Peltö-Huikko, M., Nilsson, S., Gustafsson, J.A. Cloning of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proceedings of National Academy of Sciences of United States of America*. V.93. p. 5925–5930, 1996.

Kurzer, M. S., Xu, X. Dietary phytoestrogens. *Annual Review of Nutrition*. V.17. p.353-381, 1997.

Laughton, M.J., Halliwell, B., Evans, P.J., Hoult, J.R. Antioxidant and pro-oxidant actions of plant phenolics quercetin, gossypol and myricetin. Effects on lipid peroxidation, hydroxyl radical generation and bleomycin dependant DNA damage. *Biochemical Pharmacology*. V.38. p.2859–2865, 1989.

Lehmann, L., Esch, H.L., Wagner, J., Rohnstock, L., Metzler, M. Estrogenic and genotoxic potential of equol and two hydroxylated metabolites of Daidzein in cultured human Ishikawa cells. *Toxicology Letters*. V.369, 2005.

MacGregor, J.T., Jurd, L. Mutagenicity of plant flavonoids: Structural requirements for mutagenic activity in *Salmonella typhimurium*. *Mutation Research*. V. 54. p. 297–309, 1978.

Maron, D.M., Ames, B.N. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutation Research*. V.113. p.173–215, 1983.

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.

Mattos, J.C.P. de, Dantas, F.J.S., Bezerra, R.J.A.C., Bernardo-Filho, M., Cabral-Neto, J.B., Lage, C., Leitão, A.C., Caldeira-de-Araújo, A. Damage induced by stannous chloride in plasmid DNA. *Toxicology Letters*. V.116. p.159-163, 2000.

Mazur, W. M., Duke, J. A., Wahala, K., Rasku, S., Adlercreutz, H. Isoflavonoids and lignans in legumes: Nutritional and health aspects in humans. *Journal of Nutritional Biochemistry*. V. 6. p. 193-200, 1998.

McCann, J., Yamasaki, E., Ames, B.N. Detection of carcinogens in the *Salmonella*/microsome test: assay of 300 chemicals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. V.72. p.5135-5139, 1975.

McGraw, L.J., Jager, A.X., van Staden, J. Antibacterial, anthelmintic and anti-amoebic activity in South African medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*. V.73. p.247-263, 2000.

Metodiewa, P., Jaiswal, A.K., Cenas, N., Dickanaitė, E., Segura-Aguilar, J. Quercetin may act as a cytotoxic pro-oxidant after its metabolic activation to semiquinone and quinoidal product. *Free Radical Biology and Medicine*. V.26. p.107–116, 1999

Michel, J., Duarte, R.E., Bolton, J.L., Huang, Y., Cáceres, A., Veliz, M., Soejarto, D.D., Mahadya, G.B. Medical potential of plants used by the Q'eqchi Maya of Livingston, Guatemala for the treatment of women's health complaints. *Journal of Ethnopharmacology*. V.114. p.92-101, 2007.

Micsicek, R. J. Interaction of naturally occurring nonsteroidal estrogens with expressed recombinant human estrogen receptor. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular*. V. 49. p.153-160, 1994.

Micsicek, R. J. Commonly occurring plant flavonoids have estrogenic activity. *Molecular Pharmacology*. V.44. p.37-43, 1993.

Middleton, E., Kandaswami, C. The impact of plant flavonoids on mammalian biology: implications for immunity, inflammation and cancer, in: J.B. Harborne (Ed.), *The Flavonoids*, Chapman & Hall, London, p. 619–652, 1994.

Migliore, L., Coppedè, F. Genetic and environmental factors in cancer and neurodegenerative diseases. *Mutation Research*. V.512. p.135–153, 2002.

Monks, A., Scudiero, D., Skehan, P., Shoemaker, R., Paull, K., Vistica, D., Hose, C., Langley, J., Cronies, P., Vaigro-Wolff, A., Gray-Goodrich, M., Cambell, H., Mayo, J., Boyd, M. Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. *Journal of National Cancer Institute*. V.83. p.757, 1991.

Mortelmans, K.; Zeiger, E.. The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. *Mutation Research*. V.455, n.1-2. p.29-60, 2000.

Mortelmans, K., Prival, M.J., Rao, T.K., Ray, V.A. The *Salmonella typhimurium*/mammalian microsome mutagenicity assay. A report of the US environmental Protection Agency Gene-Tox program. *Mutation Research*. V.168. p.67–238, 1986.

Mukhtar, H., Das, M., Khan, W. A., Wang, Z. Y., Bik, D. P., Bickers, D. R. Exceptional activity of tannic acid among naturally occurring plant phenols in protecting against 7,12-dimethylbenz(a)anthracene, benzo(a)pyrene, 3-methylcholanthrene and N-methyl-N-nitrosourea-induced skin tumorigenesis in mice. *Cancer Research* . V. 48. p. 2361-2365.,1988.

Muller, L., Kasper, P., Madle, S. The quality of genotoxicity testing of drugs. Experiences of a regulatory agency with new and old compounds. *Mutagenesis*. V. 6. p. 143–149, 1991.

Munro, I.C., Harwood, M., Hlywka, J.J., Stephen, A.M., Doull, J., Flamm, W.G., Adlercreutz, H. Soy isoflavones: a safety review. *Nutrition Reviews*. V.61. p.1–33, 2003.

Nichols, K.C., Schenkel, L., Benson, H. 17 betaestradiol for postmenopausal estrogen replacement therapy. *Obstetrical & Gynecological Survey*. V.39. p. 230–245, 1984.

Nilsson, S., Gustafsson, J.A. Estrogen receptor transcription and transactivation: Basic aspects of estrogen action. *Breast Cancer Research: BCR*. V.2. p.360–366, 2000.

Oh, S., Chung, K. Estrogenic activities of *Ginkgo biloba* extracts. *Life Sciences*. V.74. p. 1325 – 1335, 2004.

Osborne, C.K., Hobbs, K.I., Trent, J.M. Biological differences among MCF-7 human breast cancer cell lines from different laboratories. *Breast Cancer Research and Treatment*. V.9, p.111-121, 1987.

Payne, J., Jones, C., Lakhani, S., Kortenkamp, A. Improving the reproducibility of the MCF-7 cell proliferation assay for the detection of xenoestrogens. *The Science of the Total Environment*. V.248. p.51-62, 2000.

Perez, R.P., Godwin, A.k., Handel, L.M., Hamilton, T.C. A comparison of clonogenic, microtetrazolium and sulforhodamine B assays for determination of cisplatin cytotoxicity in human ovarian carcinoma cell lines. *European Journal of Cancer*. V.29A, p. 395, 1993.

Pratt, S. E., Pollak , M. N. Estrogen and antiestrogen modulation of MCF7 human breast cancer cell proliferation is associated with specific alterations in accumulation of Insulin-like Growth Factor-binding Proteins in conditioned media. *Cancer Research*. V.53. p.5193-5198, 1993.

Purchase, I.F.H., Longstaff, E., Ashby, J., Styles, J.A., Anderson, D., Lefevre, P.A., Westwood, F.R. An evaluation of 6 short-term tests for detecting organic chemical carcinogens. *British Journal of Cancer*. V.37. p.873–959, 1978.

Rabe, T., van Staden, J. Screening of *Plectranthus* species for antibacterial activity. *South African Journal of Botany*. V.64, p.62-65, 1998.

Rahman, A., Fazal, F., Greensill, J., Ainley, K., Parish, J.H., Hadi, S.M. *Molecular and Cellular Biochemistry*. V.111, p.2–9, 1992.

- Ramos, A., Rivero, R., Visozo, A., Piloto, J., Garcya, A. Parthenim, a sesquiterpene lactone of *Parthenium hysterophorus* L. is a high toxicity clastogen. *Mutation Research*. V.514. p. 19-27, 2002.
- Rasmussen, T.H., Nielsen, J.B. Critical parameters in the MCF-7 cell proliferation bioassay (E-Screen). *Biomarkers*. V.7. p.322-336, 2002.
- Reis Filho, R.W., Araújo, J.C. de, Vieira, E.M. Hormônios sexuais estrógenos: contaminantes bioativos. *Quimica Nova*. V.29. p. 817-822, 2006.
- Remington, R. D., Schor, M.A. Some important distributions. In: Johnson, R.A., Wichern, D.W. (Eds.), *Statistics with Applications to the Biological and Health Sciences*. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, N.J., 1985
- Rietjens, I.M.C.M., Boersma, M.G., van der Woude, H., Jeurissen, S.M.F., Schutte, M.E., Alink, G.M. Flavonoids and alkenylbenzenes: Mechanisms of mutagenic action and carcinogenic risk. *Mutation Research*. V. 574. p. 124-138, 2005.
- Rimm, E.B., Katan, M.B., Ascherio, A., Stampfer, M.J., Willett, W.C. Relation between intake of flavonoids and risk for coronary heart disease in male health professionals, *Annals of Internal Medicine*. V.125. p. 384-389, 1996.
- Rodrigues, C.M. Caracterização quali e quantitativa de metabólitos secundários em extratos vegetais. *Tese de Doutorado*, IQ/Unesp, SP – Brasil, 2007.
- Roig, T. Plantas Medicinales, Aromáticas o Venenosas de Cuba. *Ciencia y Técnica*, La Habana. p. 398-401, 1988.
- Rubinstein, L.V., Shoemaker, R.H., Paull, K.D., Simon, R.M., Tosini, S., Skehan, P., Scudiero, D.A., Monks, A. Boyd, M.R. Comparison of in vitro anticancer-drug-screening data generated with a tetrazolium assay versus a protein assay against a diverse panel of human tumor cell lines. *Journal of National Cancer Institute*. V. 82. p. 1113, 1990.
- Ruggiero, R.J., Likis, F.E. Estrogen: physiology, pharmacology, and formulations for replacement therapy. *Journal of Midwifery Women Health*. V.47 (3). p.130-138, 2002.
- Rymer, J., Wilson, R., Ballard, K. Making decisions about hormone replacement therapy. *British Medical Journal*. V.326. p.322-326, 2003.
- Sagripanti, J.L., Kraemer, K.H. Site-specific oxidative DNA damage at polyguanosines produced by copper plus hydrogen peroxide. *Journal of Biological Chemistry*. V. 264. p.1729-1734, 1989.
- Sahu, S.C., Gray, G.C. Lipid peroxidation and DNA damage induced by morin and naringenin in isolated rat liver nuclei. *Food and Chemical Toxicology*. V.35. p.443-447, 1997.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1989.

Santos, F.V., Colus, I.M.S., Silva, M.A., Vilegas, W., Varanda, E.A. Assessment of DNA damage by extracts and fractions of *Strychnos pseudoquina*, a Brazilian medicinal plant with antiulcerogenic activity. *Food and Chemical Toxicology*. V. 44. p. 1585–1589, 2006.

Shimoi, K., Nakamura, Y., Tomita, I., Kada, T. Bioantimutagenic effects of tannic acid on UV and chemically induced mutagenesis in *Escherichia coli* B/r. *Mutation Research*. V. 149. p. 17-23, 1985.

Silva, C.R., Monteiro, M.R., Rocha, H.M., Ribeiro, A.F., Caldeira-de-Araújo, A., Leitão, A.C., Bezerra, R.J.A.C., Pádula, M. Assessment of antimutagenic and genotoxic potential of senna (*Cassia angustifolia* Vahl.) aqueous extract using *in vitro* assays. *Toxicology in vitro*. V.22. p.212-218, 2008.

Silva, I.D., Rodrigues, A.S., Gaspar, J., Maia, R., Laires, A., Rue, J. Involvement of rat cytochrome P1 in the biotransformation of kaempferol to quercetin: relevance to the genotoxicity of kaempferol. *Mutagenesis*. V.12. p. 383–390, 1997.

Simões, C.M.O., Sckenkel, E.P., Gosmann, G., Mello, J.C.P., Mentz, L.A., Petrovick, P.R. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Universidade/UFRGS/UFSC, Porto Alegre/Florianópolis. 1999.

Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., McMahon, J., Vistica, D., Warren, J.T., Bokesch, H., Kenney, S., Boyd, M.R. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *Journal of the National Cancer Institute*. V.82, p.1107-1112, 1990.

Skibola, C.F., Smith, M.T. Potential health impacts of excessive flavonoid intake. *Free Radical Biology and Medicine*. V. 29. p.375–383, 2000.

Sofowora, A. *Medicinal Plants and Traditional Medicinal in Africa*. John Willey and Sons, New York, p.256, 1982.

Soto, A.M., Sonnenschein, C., Chung, K.L., Fernandez, M.F., Olea, N., Serrano, F.O. The E-SCREEN assay as a tool to identify estrogens: An update on estrogenic environmental pollutants. *Environmental Health Perspectives*. V.103 (suppl.7). p.113-122, 1995.

Soto, A.M., Lin, T.M., Justicia, H., Silva, R. M., Sonnenschein, C. An “in culture” assay to assess the estrogenicity of xenobiotics (E-Screen). *Advances in Modern Environmental Toxicology*. V.21. p.295-309, 1992.

Sparg, S.G., Jager, A.K., Van Staden, J. Efficiency of traditionally used South African plants against *Bilharzia*. *Journal of Ethnopharmacology*. V.73. p.209-214, 2000.

Soule, H.D., Vasquez, J., Long, A., Albert, S., Brennan, M.J. A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *Journal of the Nutritional Cancer Institute*. V. 51. p. 1409-1413, 1973.

Sugimura, T., Sato, S., Nagao, M., Yahagi, T., Matsushima, T., Seino, Y., Takeuchi, M., Kawachi, T. Overlapping of carcinogens and mutagens, in: P.N. Magee, S. Takayama, T. Sugimura, T. Matsushima (Eds.), *Fundamentals of Cancer Prevention*, University Park Press, Baltimore, p. 191–215, 1976.

Sun, S.W., Su, H.T. Validated HPLC method for determination of sennosides A and B in senna tablets. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. V.29. p.881–894, 2002.

Timins, J.K. Current issues in hormone replacement therapy. *New Jersey Medicine: the Journal of the Medical Society of New Jersey*. V.101. p.21–27, 2004.

Toyokuni, S., Sagripanti, J.L. Association between 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine formation and DNA strand breaks mediated by copper and iron. *Free Radical Biology & Medicine*. V.20. p.859–864, 1996.

Tsuda, H. Chromosomal aberrations induced by hydrogen peroxide in cultured mammalian cells. *Japanese Journal of Genetics*. V.56. p. 1–8, 1981.

Van Wyk, B.E., van Outshoorn, B., Gericke, N. *Medicinal Plants of South Africa*. Briza Publications, Pretoria, 1997.

Verschaeve, L., Kestens, V., Taylor, J.L.S., Elgorashi, E.E., Maes, A., Van Puyvelde, L., De Kimpe, N., Van Staden, J. Investigation of antimutagenic effects of selected South African medicinal plant extracts. *Toxicology in vitro*. V. 18. p. 29-35, 2004.

Villalobos, M., Olea, N., Brotons, J.A., Olea-Serrano, M.F., de Almodóvar, J.M.R., Pedraza, P. The E-Screen assay: A comparison of different MCF7 cell stocks. *Environmental Health Perspectives*. V.103. p.844-850, 1995

Weisburger, J.H., Hara, Y., Solan, L., Luo, F.Q., Pittman, B., Zang, E. Tea polyphenols as inhibitors of mutagenicity of major classes of carcinogens. *Mutation Research*. V.371. p.57–63, 1996.

Welch, K.D., Davis, T.Z., Van Eden, M.E., Aust, S.D. Deleterious iron-mediated oxidation of biomolecules. *Free Radical Biology and Medicine*. V.32. p.577-83, 2002.

Westendorf, J., Effenberger, K., Iznaguen, H., Basar, S. Toxicological and analytical investigations of Noni (*Morinda citrifolia*) fruit juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. V. 55. p.529-537, 2007.

Wu, A.H., Yu, M.C., Tseng, C.C., Hankin, J., Pike, M.C. Green tea and risk of breast cancer in Asian Americans. *International Journal of Cancer*. V.106. p.574–579, 2003.

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.

Zacharewski. T. In vitro bioassays for assessing estrogenic substances. *Environmental and Science Technology*. V. 31. p. 613, 1997.

Zeiger, E. Identification of rodent carcinogens and non-carcinogens using genetic toxicity tests: premises, promises, and performance. *Regulatory toxicology and pharmacology*. V.28. p.85-95, 1998.

Capítulo II

Journal of MEDICINAL FOOD

[Edit Account](#) | [Instructions & Forms](#)[Main Menu](#) → [Author Dashboard](#) → Submission Confirmation

You are logged in

Submission Confirmation

Thank you for submitting your manuscript to *Journal of Medicinal Food*.

Manuscript ID: JMF-2008-0233

Title: Mutagenic activity of *Davilla nitida* and *Davilla elliptica* evaluated in Ames and micronucleus testsAuthors: Biso, Fabiana
Reis, Mariana
Bernardi, Caroline
Rodrigues, Cleonilson
Rinaldo, Daniel
Vilegas, Wagner
Colus, Ilce Mara
Varanda, Eliana

Date Submitted: 09-Sep-2008

 [Return to](#)

Manuscript Central™ v4.11 (patent #7,257,767 and #7,263,655). © ScholarOne, Inc., 2008. All Rights Reserved.
Manuscript Central is a trademark of ScholarOne, Inc. ScholarOne is a registered trademark of ScholarOne, Inc.
[Terms and Conditions of Use](#) - [ScholarOne Privacy Policy](#) - [Get Help Now](#)

Mutagenic activity of *Davilla nitida* and *Davilla elliptica* evaluated in Ames and mice micronucleus tests

Fabiana Izilda Bisó^a, Mariana Bizarro dos Reis^b, Caroline Cristiane Bernardi^b, Clenilson Martins Rodrigues^c, Daniel Rinaldo^c, Wagner Vilegas^c, Ilce Mara de Syllos Cólus^b, Eliana Aparecida Varanda^{a*}

^a*UNESP-São Paulo State University, Department of Biological Sciences, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Araraquara, SP, Brazil*

^b*UEL-Londrina State University, Department of General Biology, Biological Sciences Center, PR, Brazil.*

^c*UNESP-São Paulo State University, Institute of Chemistry, Araraquara, SP, Brazil*

Running title: *Davilla* mutagenicity in Ames and micronucleus tests

* Corresponding author: *Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Universidade Estadual Paulista, UNESP, Rodovia Araraquara-Jaú Km 1, 14801-902, Araraquara, SP, Brazil*
Tel.: +55-16-3301-6951; Fax: +55-16-3301-6940
E-mail address: varandae@fcfar.unesp.br

ABSTRACT

Davilla nitida and *Davilla elliptica* (Dilleniaceae) are plants distributed predominantly in the *cerrado* region of South America and used in popular medicine to treat stomach diseases, diarrhea and swelling, particularly of the lymph nodes and testicles. Chemical investigation of these two plant species lead to the identification of the compounds miricetin-3-O- α -L-rhamnoside (miricitrin), quercetin-3-O- α -L-rhamnoside (quercitrin), myricetin, quercetin and gallic acid derivatives in the leaves of both *D. nitida* and *D. elliptica*. Therefore, it was concluded that the two species of *Davilla* possess qualitatively similar chemical profiles. In the present study, the mutagenic potential of crude extracts from the leaves of these plants was tested in *Salmonella typhimurium* assays, using strains TA100, TA98, TA102 and TA97a (Ames test) and in the micronucleus test, using peripheral blood cells of mice. In the assessment of mutagenic potential by the Ames test the methanol, ethanol and methanol/water extracts from both plant species induced positive responses. On the other hand, none of the extracts showed mutagenic activity in the mouse cell.

Key Words: Flavonoids, Medicinal plants, Mutations, *Salmonella typhimurium*

INTRODUCTION

The family Dilleniaceae includes eleven genera (*Acrotrema*, *Curatella*, *Davilla*, *Didesmandra*, *Dillenia*, *Doliocarpus*, *Hibbertia*, *Pachynema*, *Pinzona*, *Schumacheria* and *Tetracera*) with about 400 plant species.^{1,2} Plants of this family are trees, shrubs or climbers and their leaves in general, possess epidermal cells impregnated with silica.³ They are distributed mainly in the Savannah-like regions of the world. The genus *Davilla* is found in tropical America. *D. elliptica* A. St. -Hil is popularly known as “lixinha” due to asperity of the leaves. In Brazilian folk medicine, an infusion of the roots is used as an astringent tonic and purgative. The fresh leaves are used in baths to treat swellings, especially of lymphatic nodes and testicles.⁴ *Davilla nitida* Vahl. is a climbing shrub and it is popularly known in Brazil as “sambaibinha” or “lixerinha de rama”. It occurs mainly in the waterside gallery forest that criss-crosses the *cerrado* scrubland.⁵ Ethnopharmacological reports indicate the folk use of *D. nitida* to treat gastric problems.

Little research has been performed on the *Davilla* genus. David *et al.*² isolated α -tocopherol and the flavonoids myricetin, quercetin, myricetin-3-*O*-rhamnoside and myricetin-3'-*O*-rhamnoside from the leaves of *D. flexuosa*, while Gurni and Kubtzki¹ isolated myricetin, quercetin, myricetin-3-*O*-rhamnoside, quercetin-3-*O*-rhamnoside and kaempferol from the leaves of *D. rugosa*.

In this study we tested methanol, methanol/water and ethanol extracts of the leaves of *D. elliptica* and *D. nitida* for mutagenic activity by the in *Salmonella* microsome assay (Ames test) and the micronucleus frequency in the peripheral blood of Swiss mice. We also performed a phytochemical analysis of the methanol extract.

MATERIAL AND METHODS

Chemicals

Dimethylsulfoxide (DMSO), nicotinamide adenine dinucleotide phosphate sodium salt, D-glucose-6-phosphate disodium salt, magnesium chloride, L-histidine monohydrate, D-biotin, sodium azide, 2-anthramine and 4-nitro-*o*-phenylenediamine 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 and sodium chloride were purchased from Merck (Whitehouse Station, NJ). Cyclophosphamide was diluted in distilled water and used as a positive control and as a damage- inducing agent in the *in vivo* tests.

Plant material

Leaves of *D. nitida* Vahl. and *D. elliptica* A. St. -Hil (Dilleniaceae) were collected at Palmas, Tocantins State, Brazil and identified by Dr Solange de Fátima Lólis. Voucher specimens have been deposited at the Herbarium of Tocantins University under the accession numbers: TO4593 for *D. elliptica* St. Hil (Dilleniaceae) and TO3849 for *D. nitida* Vahl. (Dilleniaceae).

Extract preparation and isolation

The air-dried leaves of *D. elliptica* (2.0 kg) were powdered and extracted with chloroform and then with methanol. Solvents were evaporated at 60 °C under reduced pressure, affording the CHCl₃ (103.5 g) and MeOH extracts (289.8 g). The EtOH extract (187.0 g) of *D. elliptica* was prepared from the aerial parts (1.0 kg), air-dried and powdered and extracted exhaustively with ethanol at room temperature and solvent were evaporated at 60 °C under reduced pressure. From the EtOH extract it was possible to isolate two flavonoids quercetin-3-O- α -L-rhamnoside and miricetin-3-O- α -L-rhamnoside, by High-Speed Counter-Current Chromatography (HSCCC).⁶

The dried leaves of *D. nitida* (1.0 kg) were powdered and successively macerated at room temperature with CHCl₃, MeOH and finally MeOH/water. Solvents were evaporated at 60°C under reduced pressure, affording the chloroform extract (11.2 g), methanol extract (98.2 g) and methanol/water extract (64.9 g).

The MeOH extracts of *D. elliptica* and *D. nitida* were screened for phytochemicals by TLC on silica gel plates eluted with increasingly polar chloroform / methanol mixtures. TLC plates were sprayed with anisaldehyde / sulfuric acid to indicate the presence of flavonoids.⁷ The methanol extracts were then analyzed quantitatively in a high-performance liquid chromatograph equipped with a Varian ProStar 210 dual solvent pump, a ProStar 330 photodiode array detector (Walnut Creek, CA, USA) and a Rheodyne 7125 sample injector with a 20 μ L sample loop (Cotati, CA, USA). The analytical column was a Phenomenex Luna 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 composition was: 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% B (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 both for the operation of the detector and for data processing. Flavonoids were identified by retention time and by spiking with known standards, and by comparison with previously isolated compounds from *D. elliptica*.⁸ Methods using external standards were used to quantify each compound. For calibration curves, appropriate volumes of standard stock solutions of rutin (1.0 mg mL⁻¹) were diluted with methanol 75%. For quantitation, peak areas were compared with the calibration curves. Flavonol glycosides and aglycones were calculated as rutin, in the concentration range of 10-500 µg mL⁻¹ ($y = -4.81 \times 10^5 + 1.91 \times 10^5 x$, $r^2 = 0.9999$, $n = 7$, $\lambda = 360$ nm). The HPLC quantitative data were expressed as milligrams flavonoids derivative per kilogram solid extract.

Ames Mutagenicity Assay

The *Salmonella* mutagenicity assay was performed by pre-incubating the test mixture for 20–30 min⁹ with *S. typhimurium* strains TA100, TA98, TA97a and TA102, with and without metabolic activation. The metabolic activation mixture (S9) was freshly prepared before each test using an Aroclor-1254-induced rat-liver fraction purchased (lyophilized) from Moltox Molecular Toxicology Inc. *S. typhimurium* strains were kindly provided by Prof. B. Ames, University of California, Berkeley, CA, USA.

Five different doses of the compounds extracted from the leaves of *Davilla* were evaluated in this assay. All of them were diluted in DMSO, the solvent recommended by international guidelines. 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 non-toxic 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) and 100µL of bacterial culture and then incubated at 37°C for 20-30 minutes. The influence of metabolic activation was tested by replacing the buffer with 500µL of S9 mix. 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 48 h and the his⁺ revertant colonies were manually counted. All experiments were performed in triplicate. The standard mutagens 4-o-nitro-phenylenediamine (10µg/plate) for TA98 and TA97a, sodium azide (2.5 µg/plate) for TA100 and daunomycin (3 µg/plate) for TA102 were used as positive controls; 2-anthramine (0.125 µg/plate) was used for TA98, TA97a and TA100; 2-aminofluorene (10 µg/plate) for TA102, in the experiments with metabolic activation. DMSO served as the negative (solvent) control (75µL/plate).

Statistical analysis was performed with the Salanal computer program, adopting the Bernstein *et al.*¹⁰ 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 $MI \geq 2$ for at least one of the tested doses and if the response was dose-dependent.¹¹

Micronucleus test

Mutagenic activity in vivo was assessed for the methanol and ethanol extracts of *D. elliptica* and methanol/water extract of *D. nitida*. The MeOH extract of *D. nitida* do not was

assessed due low amount available to do the in vivo test. The animals, Swiss mice (*Mus musculus*), being six to eight weeks old, weighing approximately 30g, were divided into groups of ten (5 males and 5 females) for each treatment and were treated with 0.1mL of each of the solutions tested per 10g body weight and received water and food ad libitum throughout the treatment period. The extracts were assessed in three different doses: 200, 400 and 540 mg/kg b.w., via gavage. These doses were based on the solubility limit of the extract in distilled water. According to Hayashi et al.¹² the organic solvents such as DMSO are not recommended to in vivo rodent erythrocyte micronucleus assay. Moreover, data obtained with solvents that are toxic to mammals, hinder the extrapolation to human use.

The micronucleus test on peripheral blood cells was performed as described by Hayashi *et al.*,¹³ using slides pre-stained with acridine orange. Glass slides were heated to about 70°C on a hot-plate and a 10µL drop of an aqueous solution of the dye (1 mg/mL) was placed on each slide and spread evenly over the surface with the end of a second well-cleaned slide. Once dry, the slides were kept in the dark at room temperature for at least 24 h.

An internal control was established for each animal by preparing a test slide with a drop of blood taken from its tail, before the first treatment (time T_0). Thirty hours after the treatment of the animals with the test compounds (T_1), the blood was collected by perforating the caudal vein of the mouse with a needle and 5 µL drops were placed at the centre of a pre-stained slide and covered with a cover-slip (24 x 40 mm). These slides were then kept in the dark, at -20°C, for a minimum of 24 h, before cytological examination of the blood cells.

The cell preparations were examined under a fluorescence microscope (Nikon), with a blue (488 nm) excitation filter and yellow (515 nm) emission (barrier) filter, using an oil-

immersion objective. 1000 reticulocytes per treated animal were analyzed and the proportion of micronucleated (MN) cells counted.

Negative and positive control groups were established, with the treatment, respectively, of the animals with distilled water and cyclophosphamide (40 mg/kg b.w.). The mean frequencies of micronucleated cells obtained at times T_0 and T_1 in each treatment group were compared by the Student *t*-test ($p < 0.05$). The ANOVA-Tukey test was used to compare the means and standard deviations between the groups treated with extracts and the negative control group.

RESULTS

Ames test

We tested the mutagenicity of *D. nitida* and *D. elliptica* against four *Salmonella typhimurium* test strains. Table 1 shows the number of revertants per plate and the mutagenic index (MI) at the different doses of *D. nitida* extracts. Mutagenic activity was induced by the methanol extract, in strains TA98 (–S9, +S9) and TA97a (–S9), and by methanol/water extract, in strain TA98 (+S9), with a dose-related increase in the revertant number and a mutagenic index > 2 . In the other cases, no increase occurred in the number of revertant colonies. Table 2 summarizes the results obtained for each concentration of *D. elliptica* extracts. Without metabolic activation, only signs of mutagenicity (MI < 2 with a significant dose response) were observed, in TA97a, when the ethanol extract was tested. When S9 mix was added, all the extracts induced mutagenic activity in TA98. Except in the situations mentioned above, negative results were obtained.

→ insert Table 1 → Table 2

Micronucleus test

When we used the micronucleus test to assess the mutagenicity of *D. nitida* and *D. elliptica*, no significant increase was found in the number of micronucleated reticulocytes in any of the extracts tested (Table 3). In addition, there was no statistical difference between the results observed for males and females, demonstrating that gender differences do not modify the activity of the plant extract in these animals.

→ insert Table 3

DISCUSSION

The crude MeOH and MeOH/H₂O extracts from *D. nitida* and MeOH and EtOH extracts from *D. elliptica* were not mutagenic to the TA100 and TA102 bacterial strains, but induced a significant increase in the frequency of reversions in the TA98 and TA97a strains, mainly after metabolic activation with S9 (Tables 1 and 2). These results reveal that these extracts from the leaves of *D. nitida* and *D. elliptica* contain compounds that cause frameshift mutations by acting indirectly on the DNA. Nevertheless, MeOH/H₂O extracts from *D. nitida* and MeOH and EtOH extracts from *D. elliptica* in various doses did not produce any mutagenic effect in mice.

Phytochemical analysis of the extracts indicated that the main compounds extracted were flavonoids (myricetin, quercetin and derivatives – Table 4), gallic acid and tannins.

→ insert Table 4

Flavonoids are a class of natural compounds that occurs widely in plants.¹⁴ They are potentially harmful chemicals, since some have been shown to be mutagenic to bacteria and mammalian systems.^{15,16} This effect may be due to their activity as pro-oxidants,^{17,18} since they are able to generate free radicals that damage DNA or inhibit DNA-associated enzymes such as topoisomerases. Unrepaired or misrepaired oxidative DNA damage can result in DNA strand breaks and mutations¹⁹ that may lead to irreversible preneoplastic lesions.

The flavonoids present in the leaves of *D. elliptica* and *D. nitida* are qualitatively similar. The main difference is that the amount of myricetin-3-*O*- α -L-rhamnopyranoside is higher in *D. nitida* than in *D. elliptica* (Table 4). Myricetin-3-*O*- α -L-rhamnopyranoside has also been detected in methanolic extract of leaves of *Alchornea glandulosa* (Euphorbiaceae).²⁰

Myricetin is a flavonol that is widely distributed in edible plants and although it has been proved to be genotoxic in bacteria and to induce significant concentration-dependent nuclear DNA degradation concurrent with lipid peroxidation, very little is known about its mechanisms of genotoxicity.²¹ Myricetin has a more pronounced mutagenic effect than that observed for quercetin.²² It is a similar molecule to quercetin, with the addition of a sixth hydroxyl on carbon 5' of ring B.

Quercetin, another important component of the *D. elliptica* and *D. nitida* extracts, was observed in greater amounts in the species *D. nitida* than in *D. elliptica* (Table 4). According to the present results, quercetin might contribute to the observed *in vitro* mutagenic activity. Early studies of flavonoids first documented the mutagenicity of quercetin,^{23,24} with its capacity to cause base-pair substitutions and frameshift mutations in the Ames test, induce chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges in CHO cells,²⁵ and generate micronuclei in human lymphocytes in the absence and presence of metabolic activation.²⁶ Its *in vitro* mutagenic properties may be due to the formation of the quinone methides, which are active alkylating DNA-reactive intermediates.²⁷

Flavonoids have also been found to present no mutagenic properties, depending on their structure or concentration.²⁸ Aeschbacher *et al.*²⁹ used the micronucleus test and the host-mediated assay, employing the Ames *Salmonella* tester strain TA 98, to assess the mutagenicity of quercetin. Mice received concentrations about 10 times higher than the estimated average human intake of total flavonoids and no mutagenic effect was detected. Silva *et al.*³⁰ observed positive results in the SCG assay and micronucleus test in the bone marrow of mice that received very high doses of rutin and quercetin. According to these authors, it is unlikely that the consumption of ordinary amounts of rutin and quercetin produces any clastogenic effects.

In the present study, the positive mutagenicity results observed *in vitro* have not been confirmed *in vivo*. Probably the amount of quercetin present in the extracts (Table 4) is not sufficient to increase the normal number of micronucleus. Although quercetin is a strong antioxidant, which may under certain conditions have pro-oxidant properties as a result of auto-oxidation or enzymatic conversion to *ortho*-semiquinone and *ortho*-quinone/quinone methides,

in vivo, several protective mechanisms act in concert (e.g., GSH conjugation, other antioxidants, and pre- and post-absorptive biodegradation) to limit its potential to act as a pro-oxidant/genotoxicant.³¹

During the manipulation of polar extracts, (e.g. MeOH and EtOH extracts or aqueous infusions), Rodrigues *et al.*⁸ observed that after liquid-liquid extraction between ethyl acetate and water, the flavonoids are preferentially concentrated in the organic layer while condensed tannins, phenolic acids and sugars stay in the aqueous layer. Therefore, in a methanol/water extract, flavonoids should be reduced and tannins increased. It is important to understand what types of DNA damage the extracts obtained with organic solvent and from infusions can promote, considering that infusion is normally practiced in folk medicine. Tannins are a class of compounds believed to possess protective properties against the mutagenicity of the bay-region diol epoxides of polycyclic hydrocarbons;³² skin tumorigenesis induced by several chemicals in mice³³ and chemically and UV induced mutagenesis in *Escherichia coli* B/r.³⁴ Kaur *et al.*³⁵ proved the antimutagenic potential of the tannin fraction isolated from the bark of *Terminalia arjuna* (Combretaceae), a native plant in India, that may also be of benefit in the treatment of coronary artery disease, heart failure, and possibly hypercholesterolemia.

The methanolic and ethanolic extracts from *D. elliptica* showed similar chemical composition and mutagenic responses. Thus, this study shows that methanolic and methanol/water extracts from *D. nitida* and methanolic and ethanolic extracts from *D. elliptica* exhibited positive mutagenic activity in the Ames test, and quercetin, myricetin and their derivatives may be responsible for this effect, when alcoholic extraction is used.

The results obtained with these extracts encourage further investigation with regard to their chemical components, as well as to try to elucidate the mechanism involved in the mutagenesis.

The *in vivo* tests reflect human *in vivo* metabolism of the constituents. Thus, the absence of mutagenicity in these tests indicate that the extracts do not necessarily lead to mutagenic risks to humans, however, the findings of this study corroborated the need for safety studies on plants extensively used for primary health care. Such studies must be carried out before continued widespread use of some species provokes long term and irreversible damages. Plants exhibiting mutagenic properties should be considered as potentially unsafe and certainly require further testing before their continued use can be recommended.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico Tecnológico (CNPq) for a grant to W.Vilegas, E.A.Varanda, I.M.S Cólus and F.I.Biso. This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) that provided funds to the Biota-Fapesp Program.

"No competing financial interests exist."

REFERENCES

1. Gurni AA, Kubitzki K: Flavonoid chemistry and systematics of the Dilleniaceae. Biocheml. Syst. Ecol 1981; 9: 109-114.
2. David JM, Cruz FG, Guedes MLS, Chavez JP: Flavonol glycosides from *Davilla flexuosa*. J Braz Chem Soc 1996; 7:115-118.
3. Barroso GM, Guimarães EF, Ichaso CLF, Costa CG, Peixoto AL: (1978) Sistemática de angiospermas do Brasil. Livros Técnicos e Científicos. São Paulo: Ed. da Universidade de São Paulo. Brasil, 1978, 255p .
4. Rodrigues VE, Carvalho DA: Levantamento etnobotânico de plantas medicinais no domínio do cerrado na região do Alto Rio Grande - Minas Gerais. Ciênc Agrotec Lavras 2001; 25: 102-123.
5. Souza VC, Lorenzi H: Botânica Sistemática: Guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da Flora Brasileira, baseado em APG II. Ed. Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda, 2005.
6. Rinaldo D, Silva MA, Rodrigues CM, Calvo TR, Sannomiya M, Santos LC, Vilegas W, Kushima H, Hiruma-Lima CA, Brito ARMS: Preparative separation of flavonoids from the medicinal plant *Davilla elliptica* St. Hill. by High-Speed Counter-Current chromatography. Quím. Nova 200; 29: 947-949.
7. Wagner HM, Bladt S, Zgainki EM: Plant and drug analysis. Berlin, Springer, 1984.

8. Rodrigues CM, Rinaldo D, Sannomiya M, Santos LC, 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. *Phytochem Anal* 2008; 19:17-24.
9. Maron DM, Ames BN: Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat Res* 1983; 113:173-215.
10. Bernstein L, Kaldor J, McCann J, Pike MC: An empirical approach to the statistical analysis of mutagenesis data from the *Salmonella* test. *Mutat Res* 1982; 97:267–281.
11. Varella SD, Pozetti GL, Vilegas W, Varanda EA: Mutagenic activity of sweepings and pigments a household-was factory assayed with *Salmonella typhimurium*. *Food Chem Toxicol* 2004; 42: 2029-2035.
12. Hayashi M, Tice RR, MacGregor JT, Anderson D, Blakey DH, Kirsh-Volders M, Oleson FB Jr, Pacchierotti F, Romagna F, Shimada H: *In vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay. *Mutat Res* 1994; 312: 293-304.
13. Hayashi M, Morita T, Kodama Y, Sofuni T, Ishidate Jr M: The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides. *Mutat Res* 1990; 245: 245-249.
14. Rimm EB, Katan MB, Ascherio A, Stampfer MJ, Willet WC: Relations between intake of flavonoids and risk coronary heart disease in male health professionals. *Ann Intern Med* 1996; 125:384-389.

15. MacGregor JT: Mutagenic and carcinogenic effects of flavonoids. In Cody, V., Muddlenton, E., Harbone, J.B. (eds.), *Plant Flavonoids in Biology and Medicine. Biochemical Pharmacological and Structure–Activity Relationships* 1986, pp. 411–424.
16. Skibola CF, Smith MT: Potential health impacts of excessive flavonoid intake. *Free Radic Biol Med* 2000; 29: 375–383.
17. Sahu SC, Gray GC: Lipid peroxidation and DNA damage induced by morin and naringenin in isolated rat liver nuclei. *Food Cheml Toxicol* 1997; 35: 443–447.
18. Dickançaitė E, Nemeikaitė A, Kalvelytė A, Cėnas N: Prooxidant character of flavonoid cytotoxicity: structure-activity relationships. *Biochem Mol Biol Intl* 1998; 45:923–930.
19. Breimer LH: Molecular mechanisms of oxygen radical carcinogenesis and mutagenesis: the role of DNA base damage. *Mol Carcinog* 1990; 3: 188–197.
20. Calvo TR, Lima ZP, Silva JS, Ballesteros KVR, Pellizzon CH, Hiruma-Lima CA, Tamashiro J, Brito ARMS, Takahira RK, Vilegas W: Constituents and Antiulcer Effect of *Alchornea glandulosa*: Activation of Cell Proliferation in Gastric Mucosa during the healing process. *Biol Pharm Bull* 2007; 30: 451–459.
21. Silva ID, Gaspar J, Rodrigues A, Costa GG, Laires A, Rueff J: Mechanisms of myricetin mutagenicity in V79 cells: involvement of radicalar species. *Teratog Carcinog Mutagen* 1996; 16: 253–268.

22. 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. *Mol Gene Metab* 1999; 68: 468-72.
23. MacGregor JT, Jurd L: Mutagenicity of plant flavonoids: structural requirements for mutagenic activity in *Salmonella typhimurium*. *Mutat Res* 1978; 54: 297–309.
24. Brown JP, Dietrich PS: Mutagenicity of plant flavonols in the *Salmonella*/mammalian microsome test: activation of flavonol glycosides by mixed glycosidases from rat cecal bacteria and other sources. *Mutat Res* 1979; 66:223–240.
25. Carver JH, Carrano AV, MacGregor JT: Genetic effects of the flavonols quercetin, kaempferol, and galangin on Chinese hamster ovary cells *in vitro*. *Mutat Res* 1983; 113: 45–60.
26. Caria H, Chaveca T, Laires A, Rueff J: Genotoxicity of quercetin in the micronucleus assay in mouse bone marrow erythrocytes, human lymphocytes, V79 cell line, and identification of kinetochore-containing (CREST staining) micronuclei in human lymphocytes. *Mutat Res* 1995; 43: 85-94.
27. Rietjens IM, Boersma MG, van der Woude H, Jeurissen SM, Schutte ME, Alink GM: Flavonoids and alkenylbenzenes: Mechanisms of mutagenic action and carcinogenic risk. *Mutat Res* 2005; 574:124–138.
28. Delaney B, Phillips K, Vasquez C, Wilson A, Cox D, Wang HB, Manthey J: Genetic toxicity of a standardized mixture of citrus polymethoxylated flavones. *Food Chem Toxicol* 2002; 40: 617-624.

29. Aeschbacher HU, Meier H, Ruch E: Nonmutagenicity *in vivo* of the food flavonol quercetin. *Nutr Cancer* 1982; 4: 90-98.
30. Silva J, Herrmannb SM, Heusera V, Peresc W, Possa MN, Gonzalez-Gallegoe J, Erdtmanna B: Evaluation of the genotoxic effect of rutin and quercetin by comet assay and micronucleus test. *Food Chem Toxicol* 2002; 40: 941–947.
31. Harwood M, Danielewska-Nikiel B, Borzelleca JF, Flamm GW, Williams GM, Lines TC: A critical review of the data related to the safety of quercetin and lack of evidence of *in vivo* toxicity, including lack of genotoxic/carcinogenic properties. *Food Chem Toxicol* 2007; 45: 2179–2205.
32. Huang MT, Chang RL, Wood AW, Newmark HL, Sayer JM, Yagi Y, Jerina DM, Conney AM: Inhibition of the mutagenicity of the bay region diol epoxides of polycyclic hydrocarbons by tannic acid, hydroxylated anthraquinones and hydroxylated cinnamic acid derivatives. *Carcinogenesis* 1985; 6: 237-242.
33. Mukhtar H, Das M, Khan WA, Wang ZY, Bik DP, Bickers DR: Exceptional activity of tannic acid among naturally occurring plant phenols in protecting against 7,12-dimethylbenz(a)anthracene, benzo(a)pyrene, 3-methylcholanthrene and N-methyl-N-nitrosourea-induced skin tumorigenesis in mice. *Cancer Res* 1988; 48: 2361-2365.
34. Shimoi K, Nakamura Y, Tomita I, Kada T: Bioantimutagenic effects of tannic acid on UV and chemically induced mutagenesis in *Escherichia coli* B/r. *Mutat Res* 1985; 149: 17-23.

- 35.Kaur SJ, Grover IS, Kumar S: Modulatory effects of a tannin fraction isolated from *Terminalia arjuna* on the genotoxicity of mutagens in *Salmonella typhimurium*. Food Chem Toxicol 2000; 38: 1113-1119.

Table 1. Mutagenic activity and mutagenic index (MI, in parenthesis) of the extracts from *Davilla nitida* in TA98, TA97a, TA100 and TA102 *Salmonella typhimurium* strains, without (– S9) and with (+S9) metabolism.

Treatment (mg/plate)	Revertants his + (MI) / plate in <i>S. typhimurium</i> strains					
	TA98		TA97a		TA100	
	– S9	+ S9	– S9	+ S9	– S9	+ S9
MeOH						
0	27 ± 5	22 ± 3	174 ± 15	143 ± 8	194 ± 40	337 ± 7
0.9	26 ± 2	52 ± 5 ^{**}	211 ± 16	135 ± 38	176 ± 6	371 ± 23
1.9	29 ± 6	59 ± 5 ^{**}	207 ± 8	153 ± 31	158 ± 24	332 ± 25
3.8	32 ± 3	55 ± 18 [*]	255 ± 2 ^{**}	152 ± 74	171 ± 3	384 ± 37
7.5	54 ± 2 ^{**}	55 ± 9 [*]	304 ± 23 ^{**}	107 ± 1	174 ± 18	336 ± 29
11.3	41 ± 10	38 ± 14	351 ± 15 ^{**}	67 ± 23	208 ± 13	321 ± 9
MeOH/H₂O						
0	41 ± 6	22 ± 3	174 ± 15	149 ± 8	111 ± 15	337 ± 7
0.7	33 ± 7	40 ± 1 [*]	144 ± 12	121 ± 22	143 ± 8	326 ± 47
1.3	26 ± 5	45 ± 6 [*]	136 ± 10	134 ± 3	107 ± 12	346 ± 37
2.6	27 ± 5	44 ± 8 [*]	153 ± 11	125 ± 18	130 ± 13	317 ± 6
5.2	41 ± 6	33 ± 0	172 ± 16	67 ± 4	133 ± 5	368 ± 7
7.8	27 ± 2	35 ± 0	223 ± 22	41 ± 16	149 ± 8	384 ± 48
Control +	334 ± 32	381 ± 34	810 ± 40	813 ± 10	1369 ± 84	1847 ± 47

The results are reported as means ± S.D. 0 = negative control (75µL DMSO / plate). Control +: 4-o-nitro-phenylenediamine (10µg/plate) for TA98 and TA97a (– S9), sodium azide (2.5µg/plate), for TA100 (– S9), daunomycin (3µg/plate), for TA102 (– S9), 2-anthramine (0.125 µg/plate), for TA98, TA97a and TA100 (+S9), 2-aminofluorene (10µg/plate), for TA102 (+S9). MeOH:methanol extract, MeOH/H₂O: 80%methanol/water extract. *P<0.05 (ANOVA); ** P<0.01 (ANOVA).

Table 3. Frequency of micronucleated reticulocytes (MNRETs) in peripheral blood, per 1000 analyzed cells, before (T₀) and 30 h after the acute treatment with the indicated doses of the *Davilla nitida* and *Davilla elliptica* extracts and their positive and negative control groups.

Treatments (mg/kg b. w.)		Number of animals	T ₀		30 Hours	
			MNRETs	X ± SD/animal	MNRETs	X ± SD/animal
Water		10	19	1.9 ± 1.20	17	1.7 ± 0.67
Cyclophosphamide (40)		9	11	1.2 ± 0.66	174	19.3 ± 1.80*
Plant Extracts						
<i>Davilla nitida</i> (MeOH/H₂O)	200	10	9	0.9 ± 0.99	14	1.4 ± 1.50
	400	9	12	1.3 ± 1.12	13	1.4 ± 1.13
	540	9	15	1.7 ± 1.00	20	2.2 ± 1.79
<i>Davilla elliptica</i> (MeOH)	200	10	16	1.6 ± 0.97	21	2.1 ± 0.87
	400	10	12	1.2 ± 1.23	19	1.9 ± 1.52
	540	10	13	1.3 ± 0.95	10	1.0 ± 0.82
<i>Davilla elliptica</i> (EtOH)	200	10	12	1.2 ± 1.13	15	1.5 ± 0.97
	400	10	18	1.8 ± 1.03	22	2.2 ± 1.47
	540	10	13	1.3 ± 1.06	13	1.3 ± 0.95

SD = Standard deviation

MeOH : methanol extract; MeOH/H₂O 80%: 80%methanol/water extract; EtOH: ethanol extract. Water: negative control; Cyclophosphamide: positive control.

* Value different from that obtained with its respective control at T₀ (Student's *t*) and different from the others at the 5% level (ANOVA + Tukey).

Table 4. Flavonoids concentration and contents in *D. nitida* and *D. elliptica* expressed as rutin equivalents for EMeOH.

Flavonoids*	<i>D. elliptica</i>		<i>D. nitida</i>	
	Concentration (mg/kg of EMeOH)	Content (%)	Concentration (mg/kg of EMeOH)	Content (%)
1	7177.5 ± 12.0	0.72	5005.8 ± 2.1	0.50
2	1666.2 ± 12.9	0.17	1971.2 ± 20.7	0.20
3**	717.0 ± 4.4	0.07	331.4 ± 20.3	0.03
4	1837.7 ± 8.0	0.18	1726.7 ± 42.5	0.17
5	19833.0 ± 114.1	1.98	39496.5 ± 47.0	3.95
6	2199.6 ± 6.7	0.22	1474.9 ± 7.2	0.15
7**	483.9 ± 7.6	0.05	855.3 ± 7.7	0.09
8**	381.0 ± 0.1	0.04	269.7 ± 22.9	0.03
9	1241.6 ± 0.8	0.12	677.6 ± 15.9	0.07
10**	974.3 ± 5.6	0.10	457.1 ± 9.6	0.05
11	6643.3 ± 176.0	0.66	5949.7 ± 6.4	0.59
12	1268.6 ± 19.0	0.13	793.1 ± 3.9	0.08
13	1781.0 ± 10.0	0.18	4937.3 ± 26.8	0.49
14	1181.6 ± 4.6	0.12	4394.4 ± 198.7	0.44
15**	935.6 ± 0.5	0.09	928.1 ± 42.7	0.09
16**	506.6 ± 31.2	0.05	507.7 ± 15.0	0.05
17	775.2 ± 11.6	0.08	1224.9 ± 77.7	0.12

*Flavonoid identification: **1** myricetin-3-*O*-β-D-galactopyranoside, **2** myricetin-3-*O*-(2''-*O*-galloyl)-β-D-galactopyranoside, **3** NI, **4** rutin, **5** myricetin-3-*O*-α-L-rhamnopyranoside, **6** quercetin-3-*O*-β-D-galactopyranoside, **7** NI, **8** NI, **9** quercetin-3-*O*-α-L-arabinopyranoside, **10** NI, **11** quercetin-3-*O*-α-L-rhamnopyranoside, **12** myricetin, **13** myricetin-3-*O*-(2''-*O*-galloyl)-α-L-rhamnopyranoside, **14** myricetin-3-*O*-(3''-*O*-galloyl)-α-L-rhamnopyranoside, **15** NI, **16** NI, **17** quercetin.

**NI = unidentified, EMeOH= methanolic extract

Corresponding author: Eliana Aparecida Varanda

Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Universidade Estadual Paulista, UNESP, Rodovia Araraquara-Jaú Km 1, 14801-902, Araraquara, SP, Brazil

Tel.: +55-16-3301-6951; Fax: +55-16-3301-6940

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