

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

Catarine Haidê Nogueira

Avaliação da mutagenicidade e da estrogenicidade dos extratos etanólicos padronizados, frações e substâncias isoladas de *Arrabidaea brachypoda* (DC.) Bureau.

Orientadora: Profa. Dra. Eliana Aparecida Varanda

Araraquara
2015

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

**Avaliação da mutagenicidade e da estrogenicidade dos
extratos etanólicos padronizados, frações e substâncias
isoladas de *Arrabidaea brachypoda* (DC.) Bureau.**

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

Orientando(a): Catarine Haidê Nogueira
Orientador: Profa. Dra. Eliana Aparecida Varanda

Araraquara
2015

Ficha Catalográfica

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

- N778a** Nogueira, Catarine Haidê
Avaliação da mutagenicidade e da estrogenicidade dos extratos etanólicos padronizados, frações e substâncias isoladas de *Arrabidaea brachypoda* (DC.) Bureau / Catarine Haidê Nogueira. – Araraquara, 2015.
106 f.
- Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas a Farmácia.
- Orientador: Eliana Aparecida Varanda.
1. *Arrabidaea brachypoda*. 2. Mutagenicidade. 3. Estrogenicidade. 4. Teste de Ames. 4. Ensaio de leveduras recombinantes (RYA). 5. Plantas Medicinais. I. Varanda, Eliana Aparecida, orient. II. Título.

CAPES: 40500005

Dedicatória

“Aos meus pais, irmãos e ao Bruno.
Sem vocês nada disso seria possível.”

Agradecimentos

Acima de tudo agradeço a Deus que tem olhado por mim todo o tempo e me permitiu chegar até aqui.

Primeiramente agradeço uma amiga em especial, Fabiana Volpe Zanutto, que me ajudou a construir este sonho, quem me indicou a Profa. Eliana e quem me acolheu em Araraquara. Obrigada por tudo, a sementinha que você plantou ainda em Ouro Preto mudou minha vida completamente.

Agradeço à Professora Eliana Aparecida Varanda, por ter me aceitado e por ser sempre solícita, me ajudando e orientando mesmo nos momentos mais complicados. Obrigada.

À minha primeira orientadora da iniciação científica, Professora Anne Lígia Dokkedal. Obrigada por me ensinar a caminhar sozinha e por me introduzir no mundo científico.

À professora Lusânia Maria Greggi Antunes e à minha colega de laboratório Ana Paula de Oliveira Hohne, por terem aceitado compor minha banca de Qualificação e pelas dicas que ajudaram a enriquecer este trabalho.

Aos funcionários da Fcfar e da seção de pós-graduação. Obrigada por toda ajuda e orientação.

Aos meus queridos colegas de laboratório, vocês foram fundamentais. Obrigada por cada momento de discussão, aprendizados, ensinamentos, trocas e também pelos momentos de descontração. Agradeço especialmente à Paula e a Lívia, que me acolheram no laboratório e me ensinaram com carinho e paciência todas as técnicas e compartilharam comigo seus valiosos conhecimentos; e à Flávia e a Mari pela companhia, dúvidas esclarecidas e por toda ajuda na reta final. Muito obrigada, foi um prazer trabalhar e conviver com todos vocês.

Aos meus queridos colegas de Bauru, Laís, Léo e Pri. Obrigada por todo ensinamento, viagens, horas no hplc, congressos e pausa para o cafézinho. Vocês estiveram presentes lá no começo e são muito importantes para mim.

Aos meus grandes amigos que fiz em Araraquara e aos que trago de antes. Obrigada por fazer parte da minha vida e tornar essa caminhada um pouco mais fácil e prazerosa.

Às minhas queridinhas bailarinhas, especialmente o tio Juares, tia Mirela, tia Lívia, tia Mari e minha querida amiga Andreza que fiz durante as aulas. Obrigada por me devolverem a alegria de dançar novamente.

Ao Bruno Carnielli Abranches Ramos, obrigada por estar sempre comigo e por me escutar sempre que preciso. Você foi uma luz que apareceu no meu caminho e me ajuda a iluminar essa minha estrada meio torta e às vezes escura. Obrigada por se tornar meu melhor amigo e meu amor.

À minha família, por todo apoio não só financeiro, mas principalmente emocional. Pela energia, calma, paciência, pelas pizzas de sábado e almoços de domingo. Obrigada por sempre me apoiarem e nunca me deixarem desistir dos meus sonhos. Obrigada por cada oração, broncas, pelos momentos bons e ruins, vocês me ajudam todo o tempo e me fizeram ser quem eu sou. Obrigada por sempre me acolherem de volta e por todo amor que me dão.

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

A todos que contribuíram de maneira direta ou indiretamente na elaboração deste trabalho, meu muito obrigada.

Sumário

Resumo

Abstract

Lista de siglas e abreviaturas

Lista de figuras

Lista de tabelas

Capítulo 1

1. Introdução	24
1.1. Plantas medicinais.....	24
1.2. Atividade mutagênica.....	26
1.3. Atividade estrogênica.....	28
1.4. Família Bignoniaceae.....	31
1.5. Gênero <i>Arrabidaea</i>	32
1.6. <i>Arrabidaea brachypoda</i>	33
2. Objetivos	35
2.1. Geral.....	35
2.2. Específico.....	35
3. Material e Métodos	36
3.1. Obtenção do material vegetal.....	36
3.2. Preparo dos extratos, frações e compostos isolados.....	36
3.3. Avaliação da Mutagenicidade.....	38
3.3.1. Linhagens utilizadas.....	38
3.3.2. Manutenção e estoque das cepas de <i>Salmonella typhimurium</i>	39
3.3.3. Verificação das características genéticas de <i>S. typhimurium</i>	39
3.3.4. Taxa de reversão espontânea.....	40
3.3.5. Preparo do inóculo de <i>S. typhimurium</i>	40
3.3.6. Controles.....	40
3.3.7. Ensaio de mutagenicidade.....	41
3.3.8. Forma de análise dos resultados.....	42

3.4. Avaliação do potencial estrogênico.....	43
3.4.1. Linhagem e plamídeos.....	43
3.4.2. Preparo dos inóculos de <i>S. cerevisiae</i>	44
3.4.3. Ensaio de estrogenicidade.....	44
3.4.4. Forma de análise dos resultados.....	44
4. Resultados.....	48
4.1. Avaliação da mutagenicidade.....	48
4.1.1. Extrato etanólico das folhas de <i>A. brachyphoda</i>	48
4.1.2. Extrato etanólico do caule de <i>A. brachyphoda</i>	48
4.1.3. Extrato etanólico da raiz de <i>A. brachyphoda</i>	49
4.1.4. Fração aquosa e DCM das folhas de <i>A. brachyphoda</i>	52
4.1.5. Fração aquosa e DCM da raiz de <i>A. brachyphoda</i>	53
4.2. Avaliação da atividade estrogênica.....	54
4.2.1. Extrato etanólico de folhas de <i>A. brachyphoda</i>	54
4.2.2. Extrato etanólico do caule de <i>A. brachyphoda</i>	56
4.2.3. Extrato etanólico da raiz de <i>A. brachyphoda</i>	58
4.2.4. Fração aquosa das folhas de <i>A. brachyphoda</i>	60
4.2.5. Fração DCM das folhas de <i>A. brachyphoda</i>	62
4.2.6. Fração aquosa do caule de <i>A. brachyphoda</i>	64
4.2.7. Fração DCM do caule de <i>A. brachyphoda</i>	66
4.2.8. Fração aquosa da raiz de <i>A. brachyphoda</i>	68
4.2.9. Fração DCM da raiz de <i>A. brachyphoda</i>	70
4.2.10. Substâncias isoladas de <i>A. brachyphoda</i>	71
5. Discussão.....	75
5.1. Mutagenicidade.....	75
5.2. Estrogenicidade.....	79
6. Conclusões.....	82
6.1. Propriedades mutagênicas.....	82
6.2. Propriedades estrogênicas.....	83
6.3. Conclusões gerais.....	84
7. Referências bibliográficas.....	85

Capítulo 2

Anexo 1

-Lista de soluções e meios utilizados

Capítulo I.

“Nossas dúvidas são traidoras
e nos fazem perder o bem que poderíamos conquistar,
se não fosse o medo de tentar.”

William Shakespeare

Resumo

A *Arrabidaea brachypoda* (DC.) Bureau, é um arbusto nativo do Cerrado pertencente a família Bignoniaceae, é conhecida como “cipó-una” ou “tintureiro” e popularmente utilizada no tratamento de artrite. Diversas atividades para esta espécie já foram reconhecidas, tais como antifúngica, antiviral, anti-inflamatória, efeito antinociceptivo e anti-*Trypanosoma cruzi*, porém estudos que comprovem sua eficácia e segurança ainda são raros, sendo assim o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade mutagênica através do Teste de Ames e a atividade estrogênica através do ensaio de leveduras recombinantes (RYA) dos extratos, frações e substâncias isoladas de *A. brachypoda*. O Teste de Ames foi realizado com as linhagens de *Salmonella typhimurium* TA100, TA98, TA97a e TA102, com e sem ativação metabólica pelo método de pré-incubação. O Teste RYA foi realizado com a linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 com os extratos das folhas, caules, raízes, suas respectivas frações e substâncias isoladas. Todos os extratos e também a fração aquosa das folhas de *A. brachypoda* mostraram atividade mutagênica e os extratos das folhas e das raízes também apresentaram atividade estrogênica. Os resultados contribuem para os conhecimentos sobre a segurança do uso desta espécie, portanto recomendamos cautela com seu uso devido os resultados positivos quanto à mutagenicidade e acreditamos que os riscos de efeitos adversos pela atuação como alteradores endócrinos sejam baixos.

Palavras-chave

Arrabidaea brachypoda, mutagenicidade, estrogenicidade, teste de Ames, ensaio de leveduras recombinantes (RYA), plantas medicinais.

Abstract

The *Arrabidaea brachypoda* (DC.) Bureau, is a native of Cerrado shrub belonging to Bignoniaceae family, is known as "vine-one" or "dyer" and popularly used to treat arthritis. Several activity for this species have been recognized as an antifungal, antiviral, anti-inflammatory, antinociceptivo effect and anti-*Trypanosoma cruzi*, but studies proving its effectiveness and safety are still rare, thus the objective since work was to evaluate the mutagenic activity through the Ames test and the estrogenic activity by testing recombinant yeast (RYA) of the extracts, fractions and compounds of *A. brachypoda*. The Ames Test was performed with *Salmonella typhimurium* strains TA100, TA98, TA97 and TA102, with and without metabolic activation by preincubation method. The RYA test was performed with *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 strain with the extracts of the leaves, stalks, roots, their respective fractions and compounds. All the extracts and also the aqueous fraction of the leaves of *A. brachypoda* showed mutagenic activity and the extracts of leaves and roots also showed estrogenic activity. The results contribute to the knowledge about the safety of using this species, so we recommend caution with its use because the positive results regarding the mutagenicity and we believe that the risk of adverse effects by acting as endocrine changers is low.

Keywords

Arrabidaea brachypoda, mutagenicity, estrogenicity, Ames test, recombinant yeast assay (RYA), medicinal plants.

Lista de siglas e abreviaturas

AMG - Ágar Mínimo Glicosado

ANOVA- Análise de variância

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

A, C, G, T – bases nitrogenadas (adenina, citosina, guanina e timina)

BY4741 – linhagem de *Saccharomyces cerevisiae*

CETESB- Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental

CSIC- *Consejo Superior de Investigaciones Científicas*

C- - Controle negativo

C+- Controle positivo

DMSO - dimetilsufóxido

DNA - ácido desoxirribonucléico

D.O. - densidade óptica

DP – desvio padrão

EC₅₀ - concentração efetiva mediana

EEQ- Equivalente em estradiol

EPA- *Environmental Protection Agency*

EtOH- etanólico

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

Fr. Aq.- Fração aquosa

Fr. DCM- Fração diclorometânica

HE0- Receptor de estrógeno humano

His – histidina

HPLC- *High Performance Liquid Chromatography*

Kd- Constante de dissociação (fator de diluição)

Leu – leucina

Met – metionina

MG- Minas Gerais

MM- Meio Mínimo

MPLC- Cromatografia líquida de média pressão

MuGal - 4-metilumbeliferil β - D –galactosídeo

NAMS- *North American Menopause Society*

NPD- 4-nitro-o-fenilenodiamina

OMS - Organização Mundial de Saúde

PDA- *Photodiode Array Detector*

pH5HE0; pVitBX2; pAAH5; pSFL Δ -178K – plasmídeos

q.s.p.- Quantidade suficiente para

RDC- Resolução da Diretoria Colegiada

RE - receptor de estrógeno

RM – razão de mutagenicidade

RTP- *Research Triangle Institute*

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

SDS - dodecil sulfato de sódio

SUS- Sistema Único de Saúde

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

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

UNESP- Universidade Estadual Paulista

UFOP- Universidade Federal de Ouro Preto

Ura – uracila

USA- *United States of America*

UV – ultravioleta

VB- *Vogel Bonner E*

YPD – *Yeast Nitrogen Base*

Y-PER – tampão de lise

Lista de figuras

Figura 1. *Arrabidaea brachypoda* (DC.) Bureau. Fonte: Ricardo. R., 2008. Página 34.

Figura 2. Fluxograma das etapas de extração da *A. brachypoda*. Página 38.

Figura 3. Atividade estrogênica, expressa em unidades de fluorescência, das diferentes concentrações testadas do extrato das folhas de *A. brachyphoda*, utilizando a linhagem geneticamente modificada BY4741 de *S. cerevisiae*, sendo as médias das unidades de fluorescência do extrato comparadas com as do controle negativo (DMSO a 10%). Fluorescência do C+ (17- β estradiol): 5802,0. ***P<0,0001. Página 55.

Figura 4. Cinética do extrato das folhas de *A. brachyphoda*, mostrando as unidades de fluorescência em função do tempo das cinco concentrações ($\mu\text{g/poço}$), controle positivo (10 nM de estradiol) e do controle negativo (DMSO a 10%). Página 56.

Figura 5. Atividade estrogênica, expressa em unidades de fluorescência, das diferentes concentrações testadas do extrato do caule de *A. brachyphoda*, utilizando a linhagem geneticamente modificada BY4741 de *S. cerevisiae*, sendo as médias das unidades de fluorescência do extrato comparadas com as do controle negativo (DMSO a 10%). Fluorescência do C+ (17- β estradiol): 7273,0. ***P<0,0001. Página 57.

Figura 6. Cinética do extrato do caule de *A. brachyphoda*, mostrando as unidades de fluorescência em função do tempo das cinco concentrações ($\mu\text{g/poço}$), controle positivo (10 nM de estradiol) e do controle negativo (DMSO a 10%). Página 58.

Figura 7. Atividade estrogênica, expressa em unidades de fluorescência, das diferentes concentrações testadas do extrato da raiz de *A. brachyphoda*, utilizando a linhagem geneticamente modificada BY4741 de *S. cerevisiae*, sendo as médias das unidades de fluorescência do extrato comparadas com as do controle negativo (DMSO a 10%). Fluorescência do C+ (17- β estradiol): 8056,0. *** $P < 0,0001$. Página 59.

Figura 8. Cinética do extrato da raiz de *A. brachyphoda*, mostrando as unidades de fluorescência em função do tempo das cinco concentrações ($\mu\text{g/poço}$), controle positivo (10 nM de estradiol) e do controle negativo (DMSO a 10%). Página 60.

Figura 9. Atividade estrogênica, expressa em unidades de fluorescência, das diferentes concentrações testadas da fração aq. das folhas de *A. brachyphoda*, utilizando a linhagem geneticamente modificada BY4741 de *S. cerevisiae*, sendo as médias das unidades de fluorescência do extrato comparadas com as do controle negativo (DMSO a 10%). Fluorescência do C+ (17- β estradiol): 14350,0. *** $P < 0,0001$. Página 61.

Figura 10. Cinética da fração aq. das folhas de *A. brachyphoda*, mostrando as unidades de fluorescência em função do tempo das cinco concentrações ($\mu\text{g/poço}$), controle positivo (10 nM de estradiol) e do controle negativo (DMSO a 10%). Página 62.

Figura 11. Atividade estrogênica, expressa em unidades de fluorescência, das diferentes concentrações testadas da fração DCM das folhas de *A. brachyphoda*, utilizando a linhagem geneticamente modificada BY4741 de *S. cerevisiae*, sendo as médias das unidades de fluorescência do extrato comparadas com as do controle negativo (DMSO a 10%). Fluorescência do C+ (17- β estradiol): 10822,0. ***P<0,0001. Página 63.

Figura 12. Cinética da fração DCM das folhas de *A. brachyphoda*, mostrando as unidades de fluorescência em função do tempo das cinco concentrações ($\mu\text{g/poço}$), controle positivo (10 nM de estradiol) e do controle negativo (DMSO a 10%). Página 64.

Figura 13. Atividade estrogênica, expressa em unidades de fluorescência, das diferentes concentrações testadas da fração aq. do caule de *A. brachyphoda*, utilizando a linhagem geneticamente modificada BY4741 de *S. cerevisiae*, sendo as médias das unidades de fluorescência do extrato comparadas com as do controle negativo (DMSO a 10%). Fluorescência do C+ (17- β estradiol): 13794,0. ***P<0,0001. Página 65.

Figura 14. Cinética da fração aq. do caule de *A. brachyphoda*, mostrando as unidades de fluorescência em função do tempo das cinco concentrações ($\mu\text{g/poço}$), controle positivo (10 nM de estradiol) e do controle negativo (DMSO a 10%). Página 66.

Figura 15. Atividade estrogênica, expressa em unidades de fluorescência, das diferentes concentrações testadas da fração DCM do caule de *A. brachyphoda*, utilizando a linhagem geneticamente modificada BY4741 de *S. cerevisiae*, sendo as médias das unidades de fluorescência do extrato comparadas com as do controle negativo (DMSO a 10%). Fluorescência do C+ (17- β estradiol): 15677,0. *** $P < 0,0001$. Página 67.

Figura 16. Cinética da fração DCM do caule de *A. brachyphoda*, mostrando as unidades de fluorescência em função do tempo das cinco concentrações ($\mu\text{g/poço}$), controle positivo (10 nM de estradiol) e do controle negativo (DMSO a 10%). Página 68.

Figura 17. Atividade estrogênica, expressa em unidades de fluorescência, das diferentes concentrações testadas da fração aq. da raiz de *A. brachyphoda*, utilizando a linhagem geneticamente modificada BY4741 de *S. cerevisiae*, sendo as médias das unidades de fluorescência do extrato comparadas com as do controle negativo (DMSO a 10%). Fluorescência do C+ (17- β estradiol): 14874,0. *** $P < 0,0001$. Página 69.

Figura 18. Cinética da fração aq. da raiz de *A. brachyphoda*, mostrando as unidades de fluorescência em função do tempo das cinco concentrações ($\mu\text{g/poço}$), controle positivo (10 nM de estradiol) e do controle negativo (DMSO a 10%). Página 69.

Figura 19. Atividade estrogênica, expressa em unidades de fluorescência, das diferentes concentrações testadas da fração DCM da raiz de *A. brachyphoda*, utilizando a linhagem geneticamente modificada BY4741 de *S. cerevisiae*, sendo as médias das unidades de fluorescência do extrato comparadas com as do controle negativo (DMSO a 10%). Fluorescência do C+ (17- β estradiol): 11810,0. ***P<0,0001. Página 70.

Figura 20. Cinética da fração DCM da raiz de *A. brachyphoda*, mostrando as unidades de fluorescência em função do tempo das cinco concentrações ($\mu\text{g/poço}$), controle positivo (10 nM de estradiol) e do controle negativo (DMSO a 10%). Página 71.

Figura 21. Atividade estrogênica, expressa em unidades de fluorescência, das diferentes concentrações testadas da subst.01 de *A. brachyphoda*, utilizando a linhagem geneticamente modificada BY4741 de *S. cerevisiae*, sendo as médias das unidades de fluorescência do extrato comparadas com as do controle negativo (DMSO a 10%). Fluorescência do C+ (17- β estradiol): 12579,00. ***P<0,0001. Página 72.

Figura 22. Cinética subst.01 de *A. brachyphoda*, mostrando as unidades de fluorescência em função do tempo das cinco concentrações ($\mu\text{g/poço}$), controle positivo (10 nM de estradiol) e do controle negativo (DMSO a 10%). Página 72.

Figura 23. Atividade estrogênica, expressa em unidades de fluorescência, das diferentes concentrações testadas da subst.02 de *A. brachyphoda*, utilizando a linhagem geneticamente modificada BY4741 de *S. cerevisiae*, sendo as médias das unidades de fluorescência do extrato comparadas com as do controle negativo (DMSO a 10%). Fluorescência do C+ (17- β estradiol): 12443,00. *** $P < 0,0001$. Página 73.

Figura 24. Cinética subst.02 de *A. brachyphoda*, mostrando as unidades de fluorescência em função do tempo das cinco concentrações ($\mu\text{g/poço}$), controle positivo (10 nM de estradiol) e do controle negativo (DMSO a 10%). Página 73.

Figura 25. Atividade estrogênica, expressa em unidades de fluorescência, das diferentes concentrações testadas da subst.03 de *A. brachyphoda*, utilizando a linhagem geneticamente modificada BY4741 de *S. cerevisiae*, sendo as médias das unidades de fluorescência do extrato comparadas com as do controle negativo (DMSO a 10%). Fluorescência do C+ (17- β estradiol): 11683,00. *** $P < 0,0001$. Página 74.

Figura 26. Cinética subst.03 de *A. brachyphoda*, mostrando as unidades de fluorescência em função do tempo das cinco concentrações ($\mu\text{g/poço}$), controle positivo (10 nM de estradiol) e do controle negativo (DMSO a 10%). Página 74.

Lista de tabelas

Tabela 1: Rendimento dos extratos de *Arrabidaea brachypoda*. Página 37.

Tabela 2: Rendimento das frações de *Arrabidaea brachypoda*. Página 37.

Tabela 3. Atividade mutagênica expressa pelo número de revertentes/ placa \pm DP e razão de mutagenicidade (RM) do extrato etanólico das folhas de *A. brachypoda* em linhagens de *S. typhimurium* na ausência de metabolização (-S9) e presença de metabolização (+S9). Página 50.

Tabela 4. Atividade mutagênica expressa pelo número de revertentes/ placa \pm DP e razão de mutagenicidade (RM) do extrato etanólico do caule de *A. brachypoda* em linhagens de *S. typhimurium* na ausência de metabolização (-S9) e presença de metabolização (+S9). Página 50.

Tabela 5. Atividade mutagênica expressa pelo número de revertentes/ placa \pm DP e razão de mutagenicidade (RM) do extrato etanólico da raiz de *A. brachypoda* em linhagens de *S. typhimurium* na ausência de metabolização (-S9) e presença de metabolização (+S9). Página 51.

Tabela 6. Atividade mutagênica expressa pelo número de revertentes/ placa \pm DP e razão de mutagenicidade (RM) da fração aquosa e diclorometano do extrato etanólico das folhas de *A. brachypoda* na linhagem TA 98 de *S. typhimurium* na ausência de metabolização (-S9) e presença de metabolização (+S9). Página 53.

Tabela 7. Atividade mutagênica expressa pelo número de revertentes/ placa \pm DP e razão de mutagenicidade (RM) da fração aquosa e diclorometano do extrato etanólico da raiz de *A. brachypoda* na linhagem TA 98 de *S. typhimurium* na ausência de metabolização (-S9) e presença de metabolização (+S9). Página 54.

1. Introdução

1.1. Plantas medicinais

Desde tempos remotos as pessoas tentam encontrar medicamentos para aliviar a dor e curar doenças, identificando assim propriedades curativas em certas plantas e transmitindo tais conhecimentos às gerações sucessivas, assim, as plantas tem sido sempre uma boa fonte de remédios e seu uso é feito pelo homem pela necessidade de sobrevivência desde o início da civilização, levando-o à descoberta de possíveis aplicações terapêuticas de determinadas espécies. Em 1803, o farmacêutico Friedrich Wilhelm Adam Sertürner isolou a morfina da *Papaver somniferum*, marcando o início do processo de extração de princípios ativos de plantas e até o ano de 2003 cerca de 30% de todas as drogas disponíveis na terapêutica já eram derivadas de produtos naturais (CALIXTO, 2005; GAIKWAD et al., 2014; PETROVSKA, 2012; RIBEIRO, 1996; TEIXEIRA et al., 2003; TUROLLA; NASCIMENTO, 2006; VICENTINI et al., 2001).

Os usos benéficos das plantas medicinais no sistema tradicional de diversas culturas são amplamente documentados, a medicina tradicional (definida pelo conjunto dos conhecimentos, das habilidades e práticas baseadas nas teorias, crenças e experiências indígenas das diferentes culturas, sejam explicáveis ou não, usado para manter a saúde e para a prevenção, diagnóstico, melhoria ou tratamento enfermidades físicas e mentais) tem uma longa história de servir os povos de todo o mundo. Em muitos países o uso de plantas medicinais na saúde pública é a principal forma de tratamento de doenças, no continente Africano, por exemplo, 80% da

população depende do uso das plantas como alternativa aos altos custos dos fármacos sintéticos e a Organização Mundial da Saúde (OMS) calculou em 2011 que perto de 80% da população de países em vias de desenvolvimento dependa da medicina tradicional para as suas necessidades em termos de cuidados primários de saúde da população mundial (GAIKWAD et al., 2014; OMS, 2011; PETROVSKA, 2012; PIRBALOUTI et al., 2013; TUROLLA; NASCIMENTO, 2006).

Um dos problemas enfrentados pelos médicos e também pelos usuários das plantas medicinais é a falta de informações suficientes sobre sua segurança e comprovação de seus efeitos. Pensando nisso e visando uma melhoria na qualidade desses medicamentos, o Ministério da Saúde elaborou uma portaria (Portaria nº 6 /SUS de 31 de janeiro de 1995), regulamentando os procedimentos para a produção de fitoterápicos no Brasil. Posteriormente, houve a RDC-17 de 25 de fevereiro de 2000 e atualmente a RDC nº 69 de 08 de Dezembro de 2014 que regulamentam o registro, padronização, bula, boas práticas da fabricação, entre outros fatores, de medicamentos fitoterápicos. Esta preocupação das autoridades regulatórias com a normatização dos fitoterápicos propicia a avaliação de aspectos importantes, como a eficácia e segurança do uso destes medicamentos (ANVISA, 2014; NASCIMENTO et al., 2005; TUROLLA; NASCIMENTO, 2006).

A importância da regulamentação dos fitoterápicos deve-se ao fato de que muitas pessoas acreditam que o uso tradicional de diversas plantas medicinais baseado em conhecimentos populares, aliado à crença de que, por ser natural não causa reações adversas, é sinônimo de produtos saudáveis,

seguros e benéficos à saúde (TUROLLA; NASCIMENTO, 2006; VIEIRA et al., 2010).

Na Alemanha, maior produtor e consumidor europeu de preparações a base de plantas, a Fitoterapia racional é empregada com base em preparações cuja eficiência depende da dose aplicada, dos componentes ativos identificados e sua eficácia previamente comprovada por ensaios experimentais e clínicos. Certamente o avanço ocorrido na área científica permitiu o desenvolvimento de fitoterápicos confiáveis e seguros, no entanto ainda faltam estudos que comprovem a utilização segura e eficaz de várias plantas (PETROVSKA, 2012; VIEIRA et al., 2010).

1.2. Atividade mutagênica

A identificação de substâncias capazes de induzir mutações tornou-se um procedimento importante na avaliação do risco à saúde. A exposição dos seres humanos à diversos produtos químicos pode gerar efeitos deletérios como a indução mutações que podem danificar as células germinativas levando a problemas de fertilidade e mutações em gerações futuras (efeitos teratogênicos), além de também serem capazes de induzir o câncer (mutações na células somáticas) (TEJS, 2008).

As mutações podem ser do tipo gênicas ou pontuais (em que uma única base nitrogenada é modificada, ou relativamente poucas bases são inseridas ou deletadas, ou cromossômicas podem ser numéricas euploidias (envolvem genomas inteiros) ou aneuploidias (envolvem parte do genoma), e mutações cromossômicas estruturais, sendo elas: deleção, duplicação, translocação e inversão (AMES et al., 1973a; GRIFFITHS et al., 2006).

Entre os vários bioensaios “*in vitro*” de curta duração, o teste de Ames (*Salmonella typhimurium*/ his⁻ reversion assay), que detecta mutações gênicas, tem sido o mais comumente utilizado na determinação da capacidade mutagênica de grande variedade de substâncias químicas e misturas complexas, além de propiciar uma boa correlação com a carcinogenicidade (TAGLIARI et al., 1999). Estudos que determinam a sensibilidade e correlação do teste de Ames com estudos de carcinogenicidade animal tem sido realizados, estabelecendo elevada preditividade de uma resposta positiva no teste de Ames e carcinogenicidade em roedores, variando de 90 a 77%, dependendo principalmente da composição química (MORTELMANS; ZEIGER, 2000).

É um dos testes de triagem recomendados pela EPA (órgão de Controle Ambiental dos Estados Unidos) para uso em programas de monitoramento e controle de poluição ambiental (água, ar, material particulado, sedimento, resíduos sólidos e efluentes industriais), conforme CETESB.

A ANVISA no Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos, aponta a importância do uso de métodos alternativos *in vitro* em substituição a estudos *in vivo*, desde que validados e aceitos internacionalmente visando uma maior harmonização com a regulamentação internacional, evitando utilização desnecessária de animais nos estudos não clínicos, sem comprometer a obtenção e a confiabilidade de informações referentes à segurança da substância a ser testada fornecendo dados confiáveis para dar subsídios às futuras pesquisas clínicas; e ressalta o teste de Ames, por se encaixar nas características citadas, como o teste *in vitro* a ser

utilizado para estudos de genotoxicidade, desenhado para detectar o potencial das substâncias sob investigação de causar mutações gênicas (ANVISA, 2013).

O teste de ames baseia-se na utilização de diferentes linhagens de *Salmonella typhimurium*, derivadas da linhagem parental LT2, auxotrófica para histidina (his⁻), especialmente construídas para detectar mutações gênicas no DNA, como deslocamento do quadro de leitura (“*frameshift*”) ou substituição de pares de base (“*base pair substitution*”). Estas cepas incapazes de crescer em meio mínimo, isento de histidina, tornam-se prototróficas para histidina, após a exposição de uma população, a um agente mutagênico (MARON; AMES, 1983).

Para identificar agentes mutagênicos de ação indireta adiciona-se às culturas durante os ensaios a chamada fração S9, que contém enzimas de metabolização de xenobióticos e é obtida a partir do fígado de ratos. Todas essas características conferem ao Teste de Ames uma grande capacidade de identificação e caracterização de diferentes agentes mutagênicos e/ou antimutagênicos, com grande eficiência e sensibilidade (SANTOS, 2006).

1.3. Atividade estrogênica

Algumas plantas possuem componentes capazes de mimetizar o hormônio humano 17- β estradiol, chamados de fitoestrógenos, que são polifenóis não esteroidais (ZORZANO et al., 2013). Com base em suas estruturas químicas, os fitoestrógenos são divididos em quatro grupos principais: isoflavonoides, flavonoides, coumestrol e lignanas (De ANGELIS,

2001). As isoflavonas são frequentemente chamadas fitoestrógenos por se ligarem aos receptores de estrógeno. Essa ligação acontece com maior afinidade ao receptor de estrógeno- β do que receptor de estrogênio- α , além de apresentar propriedades estrogênicas agonista e antagonista (NAMS, 2004).

Entre os fitoestrógenos, a literatura destaca as isoflavonas da soja, como a daidzina e genistina, devido as suas estruturas químicas bastante semelhantes a do estrógeno humano, se comportam como estrógenos naturais, ligando-se aos receptores de estrógeno, mas não sendo capazes de causar os mesmos efeitos colaterais que esse (SIMÃO et al., 2008). Para exercer essas atividades, esses metabólitos utilizam receptores celulares que competem com o 17- β estradiol na ligação com receptores estrogênicos (KUIPER-GOODMAN et al., 1987 apud HAUSCHILD et al., 2007).

A busca por tratamentos alternativos, capazes de promover benefícios à síndrome climatérica, sem que traga efeitos colaterais e sem contra-indicações, são cada vez mais visados (NAHÁS et al., 2003). Definido pela OMS como uma fase de alterações fisiológicas no organismo da mulher, o climatério é considerado o período em que a mulher deixa de menstruar e com ele termina o ciclo de reprodução (Ministério da Saúde, 2008). Para muitas mulheres esse assunto é um tabu, pois ele é associado com o início do envelhecimento e da decadência da sexualidade, pensamento característico da cultura ocidental (BERNI et al., 2007). Apesar de todos esses fatos, têm sido os sintomas físicos, como fogachos, enjôos e sudoreses objetos da maioria dos estudos que buscam encontrar formas para que as mulheres passem por essa fase da vida de maneira saudável (PREDIGER, 2009). A terapia de reposição hormonal alivia estes sintomas, no entanto é importante ressaltar que a sua aderência é

muito baixa. Estima-se que apenas 20% das mulheres prosseguem com o tratamento durante o climatério, sendo que as demais abandonam devidos os efeitos colaterais (sangramento irregular, mastalgia, náusea, cefaléia, ganho de peso e retenção hídrica) além do receio de desenvolver câncer (GIACOMINI; MELLA, 2006).

Embora as pesquisas sobre os fitoestrógenos, em sua maioria, apontem para sua atuação positiva sobre a saúde humana, principalmente em mulheres no período da pós-menopausa como alívio dos fogachos (FERRARI, 2009), prevenção da atrofia vaginal (CHIECHI et al., 2003), redução do risco de câncer de mama (BUTLER et al., 2010; TROCK et al., 2006) entre outros, algumas pesquisas mostram essas substâncias como alteradores endócrinos com efeitos adversos para nossa saúde, como o estímulo do crescimento de células mamárias cancerosas (SAKAMOTO et al., 2009) hiperplasia endometrial (UNFER et al., 2004) redução das concentrações plasmáticas de testosterona e atrofia das glândulas sexuais em ratos machos (CLINE et al., 2004).

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

O teste RYA (Recombinant Yeast Assay) é um dos testes utilizados para avaliar o potencial estrogênico de amostras. Esse teste inclui a utilização da

levedura *Saccharomyces cerevisiae* geneticamente modificada que expressam constitutivamente o receptor de estrógeno humano. Esse ensaio responde à ligação de substâncias estruturalmente semelhantes ao estrógeno e verifica a afinidade de ligação de compostos ao receptor de estrógeno (GARCIA-REYERO et al., 2005). A expressão do gene repórter é monitorada pela atividade enzimática utilizando substratos, cujos produtos são facilmente detectados e quantificados (NOGUEROL et al., 2006).

1.4. Família Bignoniacea

A família Bignoniaceae possui distribuição pantropical e inclui cerca de 120 gêneros e 800 espécies. No Brasil, ocorrem 32 gêneros e cerca de 350 espécies (SOUZA; LORENZI, 2008). As espécies de Bignoniaceae são encontradas em diferentes tipos de ambientes, desde os cerrados abertos até as florestas úmidas e perenifólias, representando a principal família de lianas das matas brasileiras (SILVA; QUEIROZ, 2003). Os estudos químicos com Bignoniaceae demonstram uma diversidade grande de classes de metabólitos especiais, entre os quais incluem lignanas, flavonoides, iridóides, triterpenos, xantonas, naftoquinonas, ácidos cinâmicos e benzóicos e seus derivados. Os alcalóides são raramente encontrados, não se caracterizando como marcadores quimiotaxonômicos deste táxon. Um número de atividades biológicas vem sendo experimentalmente observadas para os membros dessa família, como atividade anticancerígena, antifúngica, antibacteriana e antiinflamatória. No Brasil, as plantas desta família são usadas popularmente como adstringentes, antitérmicas e para tratar reumatismos, diarreias, câncer e infecções microbianas (OLIVEIRA et al., 1990; Da ROCHA et al., 2014).

1.5. Gênero *Arrabidaea*

O gênero *Arrabidaea*, um importante representante da família Bignoniaceae, com aproximadamente 100 espécies, apresenta relevantes características químicas e biológicas. Espécies de *Arrabidaea* são distribuídas em todas as regiões do mundo. Na medicina tradicional, espécies deste gênero são utilizadas em várias aplicações terapêuticas: adstringentes, antiinflamatórios, antibióticos e antitumorais (FERRO et al., 2006).

Diversas atividades são atribuídas para espécies do gênero *Arrabidaea* entre elas ação anti-*Trypanosoma cruzi* em *A. triplinervia*, antifúngica em *A. bilabiata*, antioxidante em *A. samydoides*, contra vermes adultos de *Schistosoma mansoni* em *A. pulchra* e *A. harleyi* que é popularmente utilizada para o tratamento da caspa (ALVARENGA et al., 2012; GONZALEZ et al., 2000; LEITE et al., 2006; LIMA et al., 2003; PAULETTI et al., 2003). A espécie mais estudada deste gênero é a *A. chica*, popularmente utilizada como agente anti-diarréico, antianêmica, no tratamento de cólicas intestinais, hepatite, icterícia, leucemia e infecções de pele. Estudos apontam para ação antifúngica, tripanocida, anti-inflamatória e cicatrizante (BARBOSA et al., 2008; HOFLING et al., 2010; JORGE et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2009) e já foram relatados a presença de taninos, flavonoides (7,4-dihidroxi-5-metoxiflavona, luteolina, carajuruflavona, apigenina, escutelarina e isoescutelarina), fitoesteróis, antocianidinas e os pigmentos utilizados em cosméticos carajurona e carajurina.

Levantamentos bibliográficos revelam, de maneira geral, a presença de xantonas, flavonas (como a crisina), triterpenos pentacíclicos (como o lupeol,

3 β ,16 α -diidroxiolean-12-eno, eritrodiol e uvaol), esteroides (como o sitosterol) e ácido ursólico (PAULETTI et al., 2003) em espécies do gênero *Arrabidaea*.

1.6. *Arrabidaea brachypoda*

Arrabidaea brachypoda (DC.) Bureau (figura 1) é um arbusto nativo do Cerrado de até 70 cm de altura que pertence a família Bignoniaceae. Caracteriza-se pelas folhas simples e flores róseas-roxas em inflorescências terminais (SILVA; QUEIROZ, 2003). É conhecida como “cipó-una” ou “tintureiro” e popularmente utilizada no tratamento de dores nas articulações (artrite). Estudos demonstram atividade antifúngica, antiviral, anti-inflamatória e efeito antinociceptivo em modelos animais e mais recentemente promissora ação anti-*Trypanosoma cruzi* (ALCERITO et al., 2002; BRANDÃO et al., 2010; Da ROCHA et al., 2011; Da ROCHA et al., 2014).

Os primeiros relatos da fitoquímica da espécie apontaram a presença dos flavonoides apigenina e luteolina (BLATT et al., 1998). Alcerito et al., 2002 isolaram quatro flavonoides a partir das ceras das folhas de *A. brachypoda*: cirsimaritina, hispidulina, cirsilinol (primeiro relato na família) e 3,4-dihidroxi-5,6,7-trimetoxiflavona (primeiro relato como um produto natural), também há relatos da presença de saponinas, glicosídeos cardíacos, compostos fenólicos, taninos, esteroides, triterpenos pentacíclicos, ácido betulínico, ácido ursólico e ácido oleanólico além de três novos compostos: brachydin A, brachydin B e brachydin C no extrato das raízes (ALCERITO et al., 2002; Da ROCHA et al., 2011; Da ROCHA 2014).

Apesar dos avanços dos estudos fitoquímicos e das atividades biológicas da *A. brachypoda*, poucos examinaram a segurança do seu uso,

portanto, baseado no uso popular e nos estudos promissores das atividades biológicas da espécie este estudo tem com objetivo investigar as propriedades mutagênica, através do Teste de Ames, e estrogênica, pelo Teste RYA, dos extratos etanólicos padronizados, frações e substâncias isoladas de *A. brachypoda*.



Figura 1. Arrabidaea brachypoda (DC.) Bureau. Fonte: Ricardo. R., 2008.

2. Objetivos

2.1. Objetivos gerais

Avaliar a atividade mutagênica por meio do teste de Ames e estrogênica utilizando o ensaio de leveduras recombinantes (RYA) dos extratos etanólicos padronizados de folhas, caule e raízes, das frações diclorometano e aquosa e das substâncias isoladas de *Arrabidaea brachypoda* (DC.) Bureau, planta inserida no projeto BIOTA- Fitoterápicos padronizados como alvo para o tratamento de doenças crônicas (Projeto Temático- BIOTA FAPESP processo 2009/05237-9).

2.2. Objetivos específicos

-Avaliar a mutagenicidade, por meio do teste de Ames, dos extratos etanólicos padronizados de folhas, caule e raízes e das frações diclorometano e aquosa de *A. brachypoda* (DC.) Bureau empregando as linhagens TA100, TA98, TA97a e TA102 de *S. typhimurium*.

-Avaliar a estrogenicidade utilizando o ensaio com leveduras recombinantes (RYA) dos extratos etanólicos padronizados de folhas, caule e raízes, das frações diclorometano e aquosa e das substâncias isoladas de *A. brachypoda* (DC.) Bureau.

3. Materiais e métodos

3.1. Obtenção do material vegetal

Os extratos foram obtidos no Instituto de Química da UNESP, campus Araraquara-SP, sob coordenação do Prof. Dr. Wagner Vilegas e Profa. Dra. Lourdes Campaner dos Santos.

Como material de estudo foram utilizadas folhas, caules e raízes de *Arrabidaea brachypoda* (DC.) Bureau coletadas em abril de 2010 nas áreas de cerrado da fazenda San't Ana da Serra, situada no município de João Pinheiro (MG). A ratificação taxonômica foi realizada pela Prof^a Dr^a Ana Maria Cristina Braga Messias do Instituto de Botânica da Universidade Federal de Ouro Preto, sendo que no Herbário José Badine do Instituto de botânica da UFOP se encontra catalogada uma exsicata sob o número 17935. Após secagem completa, as folhas, caules e raízes foram trituradas separadamente em moinho de facas e pesadas dando origem a 790,34 g, 598,45 g e 498,78 g respectivamente.

3.2. Preparo dos extratos, frações e compostos isolados

O material seco foi sucessivamente extraído por percolação em temperatura ambiente, com EtOH-H₂O 70%. Os extratos etanólicos brutos foram obtidos depois de filtração e evaporados até à secura sob vácuo a aproximadamente 40°C, obtendo-se os extratos aquoso-etanol das folhas (105,0g), do caule (30,0g) e da raiz (56,0g), foi determinado o rendimento dos extratos para cada parte da planta como mostra a Tabela 1.

Tabela 1: Rendimento dos extratos de *Arrabidaea brachypoda*.

Parte da planta	Quantidade de material extraído com Etanol 70% (g)	Massa extrato(g)	Rendimento
Folhas	450,00	105,0	15%
Caules	250,00	30,0	12%
Raízes	350,00	56 g	16%

Além disso, extrações líquido/líquido com os extratos das folhas, caules e raízes foram realizadas usando-se CH_2Cl_2 (1 L) e H_2O - MeOH (7: 3) (1 L). As frações CH_2Cl_2 e aquosa-metanólica foram obtidas após a decantação e evaporação até à secura sob vácuo a aproximadamente 40°C , dando origem às respectivas frações secas, observadas na Tabela 2.

Tabela 2: Rendimento das frações de *Arrabidaea brachypoda*.

Parte da planta	Frações obtidas	Massa fração(g)	Rendimento
Folhas	DCM	6,67	47,6%
	Aquosa	8,23	52,4%
Caules	DCM	0,29	7,22%
	Aquosa	2,43	60,65%
Raízes	DCM	4,44	37,7%
	Aquosa	7,36	62,3%

A fração diclorometano oriunda do extrato da raiz (2,5 g) foi fracionada utilizando inicialmente MPLC com uma coluna Zeoprep C_{18} como fase estacionária (15-25 mm, 460 x 49 milímetros ID) (Zeochem); MeOH e ácido fórmico a 0,002% em água foram adicionados utilizando um gradiente linear de 5% a 100% de MeOH ao longo de um período de 50h. A taxa de fluxo foi de $3,5\text{mL} \times \text{min}^{-1}$, e a absorvância de UV foi detectada a 217nm. A separação MPLC gerou 235 frações. Cada fração foi analisada por HPLC-PDA. As frações 90-98 (149,9mg), frações 138-143 (275,2mg), e as frações 157-171 (298,3mg) produziram os compostos 1, 2, e 3, respectivamente.

Todas as etapas descritas acima podem ser visualizadas no fluxograma abaixo (Figura 2).

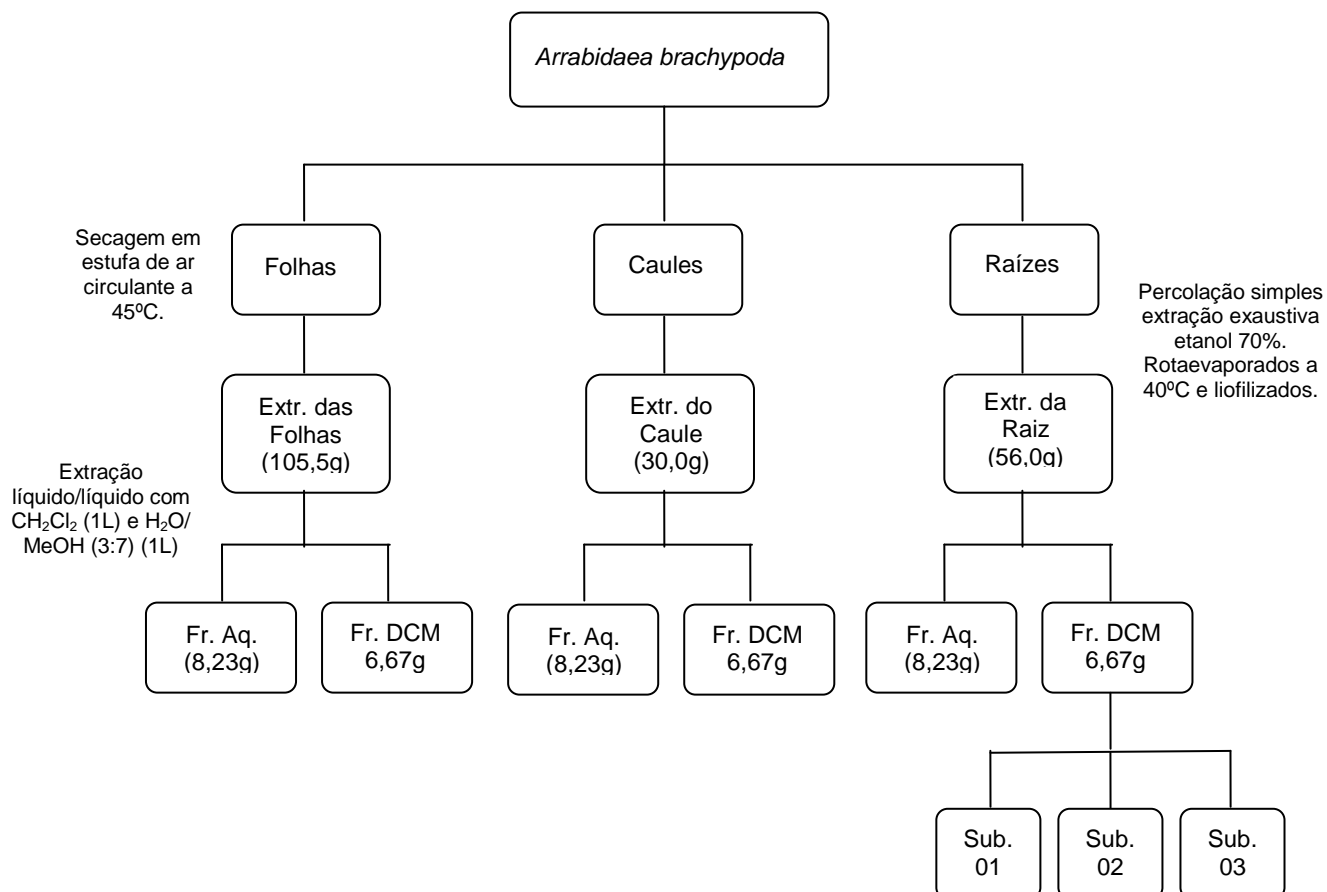


Figura 2. Fluxograma das etapas de extração da *A. brachypoda*.

3.3. Avaliação da mutagenicidade

3.3.1. Linhagens utilizadas

As linhagens TA97a TA98, TA100 e TA102 de *Salmonella typhimurium*, empregadas neste trabalho foram gentilmente cedidas pelo Dr. Bruce Ames, da Universidade Berkeley, Califórnia, USA. A cepa TA98 apresenta mutação no

gene *his D* (*hisD3052*) que codifica para a histidinol desidrogenase, apresentando como ponto preferencial para a reversão oito resíduos repetitivos de GC, e detecta compostos mutagênicos que deslocam o quadro de leitura do DNA (*frameshift*). A mutação *hisG46* presente na cepa TA100 ocorre através da substituição do códon selvagem GGG (CCC) – prolina – por GAG (CTC) – 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 *crosslink*, como 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; AMES, 1983).

3.3.2. Manutenção e estoque das cepas de *Salmonella typhimurium*

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

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

As características genéticas das cepas de *S. typhimurium* foram checadas rotineiramente, antes do preparo dos estoques para congelamento. A

dependência da histidina, presença de mutação rfa, presença de deleção uvrB e a presença de plasmídios de resistência também foram verificadas.

3.3.4. Taxa de reversão espontânea

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

3.3.5. Preparo do inóculo de *S. typhimurium*

Semeou-se com auxílio de alça de inoculação, pequena quantidade do crescimento da cultura em 30 mL de caldo nutriente (Oxoid n. 2). Incubou-se a 37° C por 14 horas em shaker com agitação de modo a obter uma densidade de $1-2 \times 10^9$ bactérias/mL.

3.3.6. Controles

O controle negativo foi feito com DMSO, solvente em que as amostras vegetais foram solubilizadas. Os controles positivos utilizados como em ensaios sem ativação metabólica foram o 4-nitrofenilenodiamino (NPD) para as linhagens TA98 e TA97a, azida sódica para a linhagem TA100 e mitomicina C para a linhagem TA102 e para os ensaios com S9 foram usados o 2-aminoantraceno (TA98, TA100 e TA97a) e o aminofluoreno (TA102).

3.3.7. Ensaio de mutagenicidade

A metodologia utilizada foi a de pré-incubação, desenvolvida por Maron; Ames (1983). Em tubos de ensaio foram adicionados 0,1mL de cultura de bactérias ($1-2 \times 10^9$ bactérias/mL), concentrações adequadas da amostra (determinada em experimentos preliminares) e 0,5mL de tampão fosfato pH 7,4 ou 0,5mL da mistura S9 (4%) no caso de ensaios com ativação metabólica. Os tubos assim compostos foram incubados a 37°C durante 20 minutos. Em seguida, foram adicionados 2mL de ágar de superfície (top-agar) acrescido de uma solução de histidina/biotina 0,05mM na proporção de 10/100mL. Em seguida, os tubos foram agitados e vertidos em placas de Petri que já continham o meio mínimo glicosado. Essas placas foram incubadas por 48 horas a 37°C. Transcorrido esse tempo, foi efetuada a contagem das colônias revertentes. Todas as concentrações testadas, controles positivos e negativos foram realizados em triplicata.

A determinação das concentrações utilizadas dos extratos foi a partir da maior massa seca do extrato solubilizada no menor volume de solvente possível, e a concentração inicial obtida foi então testada a fim de observar se há ou não toxicidade para a linhagem de *Salmonella typhimurium* avaliada.

Para analisar a atividade mutagênica foram utilizadas cinco diferentes concentrações dos extratos brutos de folhas, caule e raiz (de 12,0-1,5mg/ placa de cada extrato para as linhagens TA100, TA102 e TA97a e de 24,0-3,0 mg/placa para a linhagem TA98; de 12,0-1,5mg/placa).

Quatro concentrações diferentes foram testadas apenas para linhagem TA98 para cada fração aquosa e DCM (de 22,50-3,75mg/placa com a fr. aquosa das folhas nos experimentos com (+S9) e sem (-S9) ativação

metabólica; de 1,87-0,31 para experimentos sem S9 e de 0,31-0,05mg/placa nos experimentos com S9 na fr. DCM das folhas; de 11,25-1,87mg/placa nos experimentos sem S9, de 0,94-0,16 para os experimentos com S9 na fr. aquosa da raiz; e de 1,87-0,31mg/placa para experimentos sem S9 e de 0,31-0,05mg/placa para experimentos com S9 na a fr. DCM da raiz), dissolvidos em DMSO, para serem testados.

Em todos os ensaios subsequentes, o limite superior da gama de dosagem testada foi a dose mais elevada não-tóxica ou a dose tóxica mais baixa determinada neste ensaio preliminar. A toxicidade das amostras foi evidenciada pela redução no número de revertentes His+ em relação ao controle espontâneo ou como uma diminuição da espessura do crescimento de fundo (*background lawn*) nas placas de ágar mínimo.

3.3.8. Forma de análise dos resultados

Os dados da mutagenicidade foram analisados utilizando o programa estatístico Salanal elaborado e gentilmente cedido pelo Dr. L. Myers do Research Triangle Institute, RTP, Carolina do Norte, USA. Esse programa adotando o modelo de Bernstein et al., (1982), permite a avaliação do efeito dose-resposta através do cálculo da análise de variância (ANOVA) entre as médias do número de revertentes nas diferentes doses testadas e o controle negativo, seguido de uma regressão linear. A partir dos resultados obtidos, foi calculada a razão de mutagenicidade (RM) para cada dose analisada, que é a média do número de revertentes na placa teste (espontâneos mais induzidos) dividida pela média do número de revertentes por placa do controle negativo. A amostra foi considerada mutagênica quando a razão de mutagenicidade (RM)

foi maior ou igual a 2 em pelo menos uma das doses testadas e quando houve uma relação dose resposta entre as concentrações testadas e o número de revertentes induzidos. Por sua vez, a amostra foi considerada negativa para o teste de Ames, quando a mesma não induziu aumento significativo no número de revertentes e seus RM foram todos menores que 2. Quando apenas um dos parâmetros foi atendido, considerou-se a amostra com indícios de mutagenicidade (MORTELMANS; ZEIGER, 2000).

3.4. Avaliação do potencial estrogênico

3.4.1. Linhagem e plasmídeos

Para o experimento foi utilizada a linhagem BY4741 (MATa *ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 met15Δ0*) de *S. cerevisiae* obtida da EUROSCARF, Frankfurt, Alemanha, transformadas com os plasmídeos pH5HE0 e pVITB2x, gentilmente cedida pelo Dr. Benjamin Piña do CSIC-Barcelona, Espanha. O plasmídeo de expressão pH5HE0 contém o receptor de estrógeno humano (HE0) (GREEN e CHAMBON, 1991) clonado no vetor de expressão constitutivo da levedura, pAAH5. O plasmídeo repórter pVITB2x é derivado do pSFLΔ-178k, que contém o promotor CYC1 que regula o gene da β -galactosidase em *E. coli*. O plasmídeo pVITB2x contém duas cópias do elemento responsivo a estrógeno (ERE2) pseudo-palindrômico do gene vitelogenina B1 de *X. laevis* inserido no sítio único KpnI de pSFLΔ-178K (GARCÍA-REYERO et al., 2005).

3.4.2. Preparo dos inóculos de *S. cerevisiae*

O teste de RYA foi realizado essencialmente como descrito em Garcia-Reyero et al. (2005). A levedura BY4741 transformada com os plasmídeos pH5HE0 e pVITB2x foi descongelada do estoque à -70 °C e crescida a 30 °C, por 2-3 dias em meio mínimo SD (base nitrogenada sem aminoácidos 6,7g/L, glicose 20g/L) com ausência de uracila e leucina (-Ura-Leu) suplementado dos aminoácidos prototróficos necessários (0,1g/L de histidina e metionina). A seguir, as leveduras cresceram em meio rico YPD (extrato de levedura 5g/L, peptona 10 g/L e glicose 20 g/L) por mais 1-2 dias. Então, 10 µL dessa cultura foram inoculados em 30 mL de meio mínimo, o qual foi incubado a 30 °C até atingir D.O.600nm = 0,1.

3.4.3. Ensaio de estrogenicidade

O teste de RYA foi realizado como descrito em Garcia-Reyero et al. (2005). Para o ensaio de RYA, utilizou-se uma placa de microtitulação de polipropileno de 96 poços, previamente siliconada. A determinação da concentração foi em virtude do valor que obteve melhor resposta frente ao ensaio sem apresentar toxicidade para as leveduras *Saccharomyces cerevisiae*. Foram testadas diversas concentrações entre 75,0 e 0,75mg/mL. A melhor concentração para o extrato das folhas e raiz foi de 1,5mg/mL resultando nas diluições de 7,5-0,1µg/poço nas placas. Para o extrato do caule a concentração utilizada foi de 75mg/mL e diluições de 375,0-4,6µg/poço. Para as frações aquosa e diclorometano das folhas foram testadas concentrações entre 75,0 e 1,5mg/mL e a melhor foi de 7,5mg/mL resultando em diluições de 37,5-0,46µg/poço nas placas. Para as frações aquosa e diclorometano do caule

foram testadas concentrações entre 75,0 e 7,5mg/mL e utilizada a concentração de 7,5mg/mL e diluições de 37,5-0,46µg/poço nas placas. Por fim as concentrações entre 75,0 e 0,75mg/mL foram testadas para as frações aquosa e diclorometano da raiz e a utilizada foi de 75mg/mL e diluições entre 375,0-4,6µg/poço nas placas. Para as substâncias isoladas foram testadas concentrações entre 8,0 e 4,0mg/mL e utilizou-se para a substância 1 a concentração 4,2mg/mL e diluições de 21,00-0,26µg/poço nas placas. Para a substância 2 a concentração utilizada foi de 4,0mg/mL e diluições de 20,00-0,25µg/poço nas placas e para a substância 3 foi utilizada a concentração de 4,4mg/mL e diluições entre 22,00-0,27µg.

Adicionou-se à fileira A, 90µL da cultura final contendo D.O de 0,1 e 10µL das amostras dissolvidas em DMSO. Nas demais fileiras foram adicionados 50µL da cultura de leveduras e então realizada diluições sucessivas, onde 25µL foram transferidos sequencialmente da primeira para a segunda fileira e assim sucessivamente até a quinta fileira. Obtendo-se assim soluções com fatores de diluição de 1:10, 1:30, 1:90, 1:270, 1:810. Cinco concentrações das amostras foram testadas em triplicata, em cada placa. O controle de viabilidade consistiu de 25µL provenientes da fileira A de diluição do composto teste transferidos para a fileira F, levedura e 17-β estradiol a 10nM. Como controle negativo foi utilizado DMSO a 10% (maior concentração de solvente utilizado no ensaio) e levedura na fileira G; e como controle positivo utilizou-se 17-β estradiol (Sigma Aldrich – Brasil) a 10nM/orifício e levedura na oitava e última fileira. As microplacas foram incubadas por 6 horas a 30°C com agitação. Em seguida, 50µL de tampão de lise (Y-PER, Pierce, Rockford, USA) foram adicionados a cada orifício e a microplaca foi novamente incubada na

mesma temperatura por mais 30 minutos. A seguir, foram adicionados 50µL de tampão suplementado com 0,1% de mercaptoetanol e 0,25% da solução de 4-metilumbeliferona-β-D-galactopiranosídeo (MuGal). Após breve centrifugação as microplacas tiveram sua fluorescência resultante lidas em espectrofotômetro (355 nm de excitação e 460 nm de emissão).

3.4.4. Forma de análise dos resultados

Este ensaio quantifica a atividade estrogênica, a qual é calculada como equivalentes de estradiol (EEQ), ou seja, a quantidade de estradiol necessária para produzir uma resposta semelhante a da amostra avaliada. A fluorescência foi medida durante 15-20 minutos (uma medida por minuto) e os valores da atividade da β-galactosidase foi avaliada pelo aumento das unidades de fluorescência em relação ao tempo, usando o método de regressão linear padrão de acordo com a seguinte equação (CÉSPEDES et al., 2005):

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

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

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

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

onde R_0 representa as unidades de β -galactosidase obtidas sem ligante (ou substância teste), R as unidades de β -galactosidase obtidas na concentração do ligante (L) e R_{max} as unidades de β -galactosidase obtidas na concentração do ligante saturante. K_d representa a constante de dissociação do complexo hormônio-ligante (CÉSPEDES et al.,2005). A partir dos dados disponíveis obteve-se os valores de EEQ geral (nM) \pm DP (média de 3 experimentos independentes realizados em triplicata).

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

$$EC_{50} = \frac{\text{Concentração inicial (solução mãe)}}{\text{Fator de diluição (Kd)}}$$

4. Resultados

4.1. Avaliação da mutagenicidade

4.1.1. Extrato etanólico das folhas de *A. brachypoda*

A Tabela 3 mostra o número médio de revertentes/placa, o desvio-padrão (DP) e a razão de mutagenicidade, após o tratamento com as cinco concentrações dos extratos etanólicos das folhas, observados nas linhagens de *S. typhimurium* TA98, TA100, TA97a e TA102, na presença (+S9) e ausência (-S9) de ativação metabólica. A atividade mutagênica foi considerada negativa para as linhagens TA100, TA102 e TA97a em todas as concentrações testadas (1,5; 3,0; 6,0; 9,0 e 12,0mg/placa), tanto na ausência e na presença de metabolização para o extrato das folhas. No entanto para a linhagemTA98 o extrato das folhas, testado nas concentrações de 3,0; 6,0; 12,0; 18,0 e 24,0mg/placa, induziu um aumento significativo no número de colônias revertentes quando comparados ao controle negativo, portanto foi mutagênico tanto na ausência quanto na presença de ativação metabólica com razão de mutagenicidade superior a 2,0 nas concentrações acima de 12,0mg/placa (-S9) e na concentração de 24,0mg/placa (+S9).

4.1.2. Extrato etanólico do caule de *A. brachypoda*

A avaliação dos dados obtidos através do ensaio de Ames com o extrato do caule de *A. brachyphoda* nos permite afirmar que a amostra testada nas concentrações de 1,5; 3,0; 6,0; 9,0 e 12,0 mg/placa não se apresentou mutagênica para as linhagens TA100, TA102 e TA97a quanto testado tanto na

ausência quanto na presença da fração S9, porém para a linhagem TA98 testado na ausência de metabolização o extrato do caule foi mutagênico apresentando razão de mutagenicidade 2,0 na maior concentração testada (24,0mg/placa). Além disso, o extrato de caule testado para as linhagens TA98 e TA97a na presença de metabolização foi considerado com indícios de mutagenicidade apresentando em praticamente todas as concentrações razões de mutagenicidade próximas a 2,0 e relação dose-resposta, como por ser visualizado na Tabela 4.

4.1.3. Extrato etanólico da raiz de *A. brachypoda*

O extrato etanólico da raiz de *A. brachypoda* foi testado nas concentrações de 1,5; 3,0; 6,0; 9,0 e 12,0 mg/placa para as linhagens TA100, TA102 e TA97a e nas concentrações de 3,0; 6,0; 12,0; 18,0 e 24,0 mg/placa para a linhagem TA98. A avaliação dos dados obtidos através do ensaio de Ames nos permite afirmar que a amostra testada para as linhagens TA100 e TA102, tanto na ausência quanto na presença da mistura S9, e nos ensaios com a TA97a apenas na ausência de metabolização, tiveram resultados negativos para mutagenicidade, mas para a linhagem TA98 na ausência de metabolização o extrato se apresentou mutagênico com razão de mutagenicidade igual a 2,0 na concentração de 24,0mg/placa. Para as linhagens TA98 e TA97a na presença de metabolização o extrato também foi considerado com indícios de mutagenicidade apresentando razão de mutagenicidade de 1,9 e 1,8 para a concentração de 3,0mg/placa respectivamente. Os resultados obtidos podem ser observados na Tabela 5.

Tabela 3. Atividade mutagênica expressa pelo número de revertentes/ placa \pm DP e razão de mutagenicidade (RM) do extrato etanólico das folhas de *A. brachypoda* em linhagens de *S. typhimurium* na ausência de metabolização (-S9) e presença de metabolização (+S9).

Extrato das folhas de <i>Arrabidaea brachyphoda</i>											
TA 98		TA 100			TA 102			TA 97a			
Treatment	- S9	+ S9	Treatment	- S9	+ S9	Treatment	- S9	+ S9	Treatment	- S9	+ S9
DMSO	27 \pm 3	33 \pm 1	mg/placa								
			DMSO	201 \pm 3	97 \pm 5		384 \pm 16	445 \pm 11		104 \pm 12	137 \pm 7
3	31 \pm 3 (1,1)	57 \pm 4** (1,7)	1,5	223 \pm 1 (1,1)	116 \pm 8 (1,2)	287 \pm 24 (0,7)	411 \pm 43 (0,9)	188 \pm 8 (1,4)			
6	43 \pm 3** (1,6)	52 \pm 3** (1,6)	3	230 \pm 14 (1,1)	92 \pm 3 (0,9)	332 \pm 4 (0,9)	444 \pm 28 (1,0)	163 \pm 5 (1,2)			
12	59 \pm 6** (2,2)	59 \pm 8* (1,8)	6	252 \pm 9 (1,3)	93 \pm 2 (1,0)	412 \pm 25 (1,1)	394 \pm 5 (0,9)	192 \pm 8 (1,4)			
18	64 \pm 2** (2,4)	63 \pm 6** (1,9)	9	257 \pm 2 (1,3)	101 \pm 2 (1,0)	368 \pm 31 (1,0)	446 \pm 17 (1,0)	129 \pm 9 (0,9)			
24	81 \pm 4** (3,0)	69 \pm 6** (2,1)	12	258 \pm 13 (1,3)	100 \pm 5 (1,0)	403 \pm 27 (1,0)	454 \pm 8 (1,0)	123 \pm 6 (0,9)			
Controle +	935 \pm 44 ^a	1395 \pm 76 ^d	Controle +	1626 \pm 92 ^b	1300 \pm 62 ^d	1404 \pm 42 ^c	1208 \pm 72 ^e	1004 \pm 29 ^d			

DMSO: 100 μ L/placa (Controle negativo); Controles positivos: ^a 4-nitro-*o*-phenilenediamina - 10 μ g/placa; ^b azida sódica -1,25 μ g/placa; ^c Mitomicina 0,5 μ g/placa; ^d 2-Aminoantraceno- 1,25 μ g/placa; ^e Aminofluorene 1,25 μ g/placa. *P<0,05 e **P<0,01.

Tabela 4. Atividade mutagênica expressa pelo número de revertentes/ placa \pm DP e razão de mutagenicidade (RM) do extrato etanólico do caule de *A. brachypoda* em linhagens de *S. typhimurium* na ausência de metabolização (-S9) e presença de metabolização (+S9).

Extrato do caule de <i>Arrabidaea brachyphoda</i>											
TA 98		TA 100			TA 102			TA 97a			
Treatment	- S9	+ S9	Treatment	- S9	+ S9	Treatment	- S9	+ S9	Treatment	- S9	+ S9
DMSO	27 \pm 3	33 \pm 1	mg/placa								
			DMSO	201 \pm 3	97 \pm 5		384 \pm 16	445 \pm 11		104 \pm 12	137 \pm 7
3	36 \pm 3 (1,3)	55 \pm 2** (1,7)	1,5	210 \pm 7 (1,0)	108 \pm 5 (1,1)	444 \pm 42 (1,2)	436 \pm 6 (1,0)	248 \pm 8** (1,8)			
6	41 \pm 1** (1,5)	60 \pm 7* (1,8)	3	246 \pm 1 (1,2)	83 \pm 7 (0,9)	436 \pm 91 (1,1)	384 \pm 12 (0,9)	259 \pm 9** (1,9)			
12	45 \pm 5* (1,7)	49 \pm 3** (1,5)	6	233 \pm 6 (1,2)	117 \pm 4 (1,2)	480 \pm 17 (1,1)	405 \pm 7 (0,9)	233 \pm 1** (1,7)			
18	40 \pm 3* (1,5)	56 \pm 4** (1,7)	9	234 \pm 11 (1,2)	139 \pm 10 (1,4)	499 \pm 8 (1,3)	449 \pm 5 (1,0)	215 \pm 6** (1,6)			
24	55 \pm 5** (2,0)	59 \pm 4** (1,8)	12	252 \pm 9 (1,3)	121 \pm 9 (1,2)	322 \pm 21 (0,8)	445 \pm 5 (1,0)	192 \pm 8** (1,4)			
Controle +	935 \pm 44 ^a	1395 \pm 76 ^d	Controle +	1626 \pm 92 ^b	1300 \pm 62 ^d	1404 \pm 42 ^c	1208 \pm 72 ^e	1004 \pm 29 ^d			

DMSO: 100 μ L/placa (Controle negativo); Controles positivos: ^a 4-nitro-*o*-phenilenediamina - 10 μ g/placa; ^b azida sódica -1,25 μ g/placa; ^c Mitomicina 0,5 μ g/placa; ^d 2-Aminoantraceno- 1,25 μ g/placa; ^e Aminofluorene 1,25 μ g/placa. *P<0,05 e **P<0,01.

Tabela 5. Atividade mutagênica expressa pelo número de revertentes/ placa \pm DP e razão de mutagenicidade (RM) do extrato etanólico da raiz de *A. brachypoda* em linhagens de *S. typhimurium* na ausência de metabolização (-S9) e presença de metabolização (+S9).

Tratamento		TA 98		TA 100		TA 102		TA 97a	
mg/placa	- S9	+ S9	- S9	+ S9	- S9	+ S9	- S9	+ S9	- S9
DMSO	27 \pm 3	33 \pm 1	DMSO	201 \pm 3	97 \pm 5	384 \pm 16	445 \pm 11	104 \pm 12	137 \pm 7
3	33 \pm 5 (1,2)	64 \pm 9*(1,9)	1,5	236 \pm 2 (1,2)	121 \pm 7 (1,2)	291 \pm 9 (0,8)	457 \pm 28 (1,0)	105 \pm 16 (1,0)	246 \pm 15**(1,8)
6	40 \pm 1**(1,5)	45 \pm 3*(1,3)	3	224 \pm 2 (1,1)	128 \pm 1 (1,3)	307 \pm 49 (0,8)	406 \pm 8 (0,9)	108 \pm 25 (1,0)	215 \pm 8**(1,6)
12	33 \pm 4 (1,2)	40 \pm 1**(1,2)	6	231 \pm 5 (1,1)	115 \pm 5 (1,2)	416 \pm 6 (1,0)	402 \pm 9 (0,9)	119 \pm 21 (1,1)	188 \pm 2**(1,4)
18	39 \pm 3*(1,4)	52 \pm 2**(1,6)	9	223 \pm 5 (1,1)	122 \pm 5 (1,3)	347 \pm 16 (0,9)	443 \pm 38 (1,0)	110 \pm 4 (1,1)	170 \pm 8*(1,2)
24	55 \pm 1**(2,0)	49 \pm 1**(1,5)	12	239 \pm 8 (1,2)	118 \pm 4 (1,2)	387 \pm 11 (1,0)	413 \pm 13 (0,9)	112 \pm 11 (1,1)	159 \pm 9 (1,2)
Controle +	935 \pm 44 ^a	1395 \pm 76 ^d	Controle +	1626 \pm 92 ^b	1300 \pm 62 ^d	1404 \pm 42 ^c	1208 \pm 72 ^e	1003 \pm 36 ^a	1004 \pm 29 ^d

DMSO: 100 μ L/placa (Controle negativo); Controle positivo: ^a 4-nitro-o-phenilenediamina - 10 μ g/placa; ^b azida sódica -1,25 μ g/placa; ^c Mitomicina 0,5 μ g/placa; ^d 2-Aminoantraceno- 1,25 μ g/placa; ^e Aminofluorene 1,25 μ g/placa. *P<0,05 e **P<0,01.

4.1.4. Frações aquosa e DCM das folhas de *A. brachypoda*

Os experimentos com a fração aquosa oriunda do extrato das folhas foram realizados apenas com a linhagem TA98. A escolha da linhagem para continuação dos experimentos se deu pela mutagenicidade apresentada por todos os extratos quando ensaiados com esta linhagem.

A avaliação dos experimentos realizados através do teste de Ames com a fração aquosa oriunda do extrato das folhas de *A. brachyphoda* com a linhagem TA98 nas concentrações de 3,75; 7,50; 15,00 e 22,50 mg/placa e com a fração DCM os testes se sucederam nas concentrações de 0,31; 0,62; 1,25 e 1,87 mg/placa nos experimentos sem a presença da fração S9 e nas concentrações de 0,05; 0,10, 0,21 e 0,31 mg/placa nos experimentos com a presença da fração S9; apenas a fração aquosa na ausência de ativação metabólica foi mutagênica com razão de mutagenicidade de 2,1 para a concentração de 22,50mg/placa. A fração aquosa na presença ativação metabólica e a fração DCM na ausência não foram mutagênicas com índices de razão de mutagenicidade sempre inferiores a 2,0. A fração DCM na presença da mistura S9 apresentaram valores de razão de mutagenicidade próximos a 2,0 e relação dose-resposta sendo considerada com indícios de mutagenicidade. Os resultados descritos acima podem ser vistos na Tabela 6.

Tabela 6. Atividade mutagênica expressa pelo número de revertentes/ placa \pm DP e razão de mutagenicidade (RM) da fração aquosa e diclorometano do extrato etanólico das folhas de *A. brachypoda* na linhagem TA 98 de *S. typhimurium* na ausência de metabolização (-S9) e presença de metabolização (+S9).

Frações das Folhas de <i>Arrabideae brachyphoda</i>						
Fração aquosa			Fração DCM			
Tratamento	Tratamento		Tratamento	Tratamento		
mg/placa	- S9	+ S9	mg/placa	- S9	mg/placa	+S9
DMSO	16 \pm 2,5	29 \pm 3,6	DMSO	16 \pm 2,5	DMSO	17 \pm 1,5
3,75	26 \pm 3,2* (1,7)	28 \pm 4,6 (0,9)	0,31	19 \pm 2,0 (1,2)	0,05	26 \pm 3,5* (1,5)
7,50	19 \pm 5,5 (1,2)	33 \pm 8,0 (1,1)	0,62	22 \pm 1,2 (1,4)	0,10	27 \pm 5,2 (1,6)
15,00	28 \pm 3,6* (1,8)	38 \pm 4,0 (1,3)	1,25	19 \pm 3,6 (1,2)	0,21	29 \pm 2,3** (1,7)
22,50	32 \pm 12,2 (2,1)	45 \pm 6,8 (1,5)	1,87	21 \pm 2,6 (1,3)	0,31	30 \pm 1,1** (1,8)
Controle +	1353 \pm 129,88 ^a	639 \pm 247,2 ^b	Controle +	1353 \pm 129,88 ^a	Controle +	2627 \pm 403,11

DMSO: 100 μ L/placa (Controle negativo); Controle positivo: ^a 4-nitro-o-phenilenediamina - 10 μ g/placa; ^b 2-Aminoantraceno- 1,25 μ g/placa. *P<0,05 e **P<0,01.

4.1.5. Frações aquosa e DCM da raiz de *A. brachypoda*

A fração aquosa obtida através do extrato da raiz de *A. brachyphoda* foi investigada pelo teste de Ames apenas com a linhagem TA98, conforme esclarecido no item 4.1.4. Os ensaios foram realizados nas concentrações de 1,87; 3,75; 7,50 e 11,25mg/placa na ausência (-S9) de metabolização e nas concentrações de 0,16; 0,31; 0,62 e 0,94 mg/placa na presença (+S9) de metabolização; não comportando-se como um agente mutagênico em nenhuma circunstâncias testadas.

A fração DCM proveniente do extrato da raiz de *A. brachyphoda* ao ser avaliada através do teste de Ames, também como descrito no item 4.1.4., nas concentrações de 0,31; 0,62; 1,25 e 1,87 mg/placa para os experimentos sem a fração S9 não se mostrou ser mutagênica em nenhuma das situações. Ao ser avaliada nas concentrações de 0,05; 0,10; 0,21 e 0,31 mg/placa para os experimentos com a fração S9, a amostra foi considerada com indícios de mutagenicidade, conforme a Tabela 7.

Tabela 7. Atividade mutagênica expressa pelo número de revertentes/ placa \pm DP e razão de mutagenicidade (RM) da fração aquosa e diclorometano do extrato etanólico da raiz de *A. brachypoda* na linhagem TA 98 de *S. typhimurium* na ausência de metabolização (-S9) e presença de metabolização (+S9).

Frações da Raiz de <i>Arrabidaea brachyphoda</i>							
Fração aquosa				Fração DCM			
Tratamento		Tratamento		Tratamento		Tratamento	
mg/placa	- S9	mg/placa	+ S9	mg/placa	- S9	mg/placa	+S9
DMSO	18 \pm 1,0	DMSO	17 \pm 1,5	DMSO	16 \pm 2,5	DMSO	17 \pm 1,5
1,87	22 \pm 4,4 (1,2)	0,16	25 \pm 3,1* (1,5)	0,31	19 \pm 3,8 (1,2)	0,05	24 \pm 1,5* (1,5)
3,75	20 \pm 2,6 (1,1)	0,31	24 \pm 3,5 (1,4)	0,62	22 \pm 6,0 (1,4)	0,10	28 \pm 1,1** (1,7)
7,50	23 \pm 8,4 (1,3)	0,62	22 \pm 1,1* (1,3)	1,25	19 \pm 3,0 (1,2)	0,21	28 \pm 1,5** (1,7)
11,25	24 \pm 8,4 (1,3)	0,94	24 \pm 2,9* (1,5)	1,87	21 \pm 2,6 (1,3)	0,31	27 \pm 1,0** (1,6)
Controle +	1163 \pm 284,1 ^a	Controle +	2627 \pm 403,11	Controle +	1353 \pm 129,9 ^a	Controle +	2627 \pm 403,11

DMSO: 100 μ L/placa (Controle negativo); Controle positivo: ^a 4-nitro-o-phenilenediamina - 10 μ g/placa; ^b 2- Aminoantraceno-1,25 μ g/placa. *P<0,05 e **P<0,01.

4.2. Avaliação da atividade estrogênica

4.2.1. Extrato etanólico das folhas de *A. brachypoda*

O extrato etanólico das folhas de *A. brachypoda* foi avaliado quanto à atividade estrogênica através do teste com leveduras recombinantes (RYA), partindo de 1,5mg/mL, sendo realizados três experimentos independentes em triplicata. Os resultados foram dados como equivalentes de estradiol (EEQ) e EC₅₀. O extrato das folhas de *A. brachypoda* obteve EEQ de 7,37nM \pm 1,31 e EC₅₀, obtido através do cálculo da concentração efetiva mediana foi de 56,16g/mL. A atividade estrogênica também pode ser avaliada através da atividade da enzima β -galactosidase (expressada quando há ligação da amostra aos receptores de estrógeno) em unidades de fluorescências, obtidas através das 20 leituras sequenciais (uma por minuto) foram analisados por meio de gráficos para melhor visualização dos resultados obtidos evidenciando a comparação entre os valores de fluorescência em relação a concentração

utilizada (Figura 3) e a cinética do experimento ao comparar as unidades de fluorescência em relação ao tempo (Figura 4).

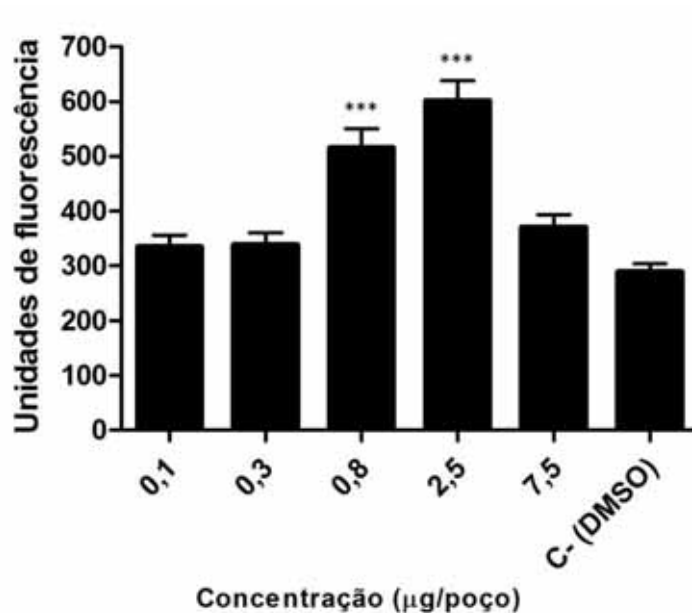


Figura 3. Atividade estrogênica, expressa em unidades de fluorescência, das diferentes concentrações testadas do extrato das folhas de *A. brachyphoda*, utilizando a linhagem geneticamente modificada BY4741 de *S. cerevisiae*, sendo as médias das unidades de fluorescência do extrato comparadas com as do controle negativo (DMSO a 10%). Fluorescência do C+ (17- β estradiol): 5802,0. ***P<0,0001.

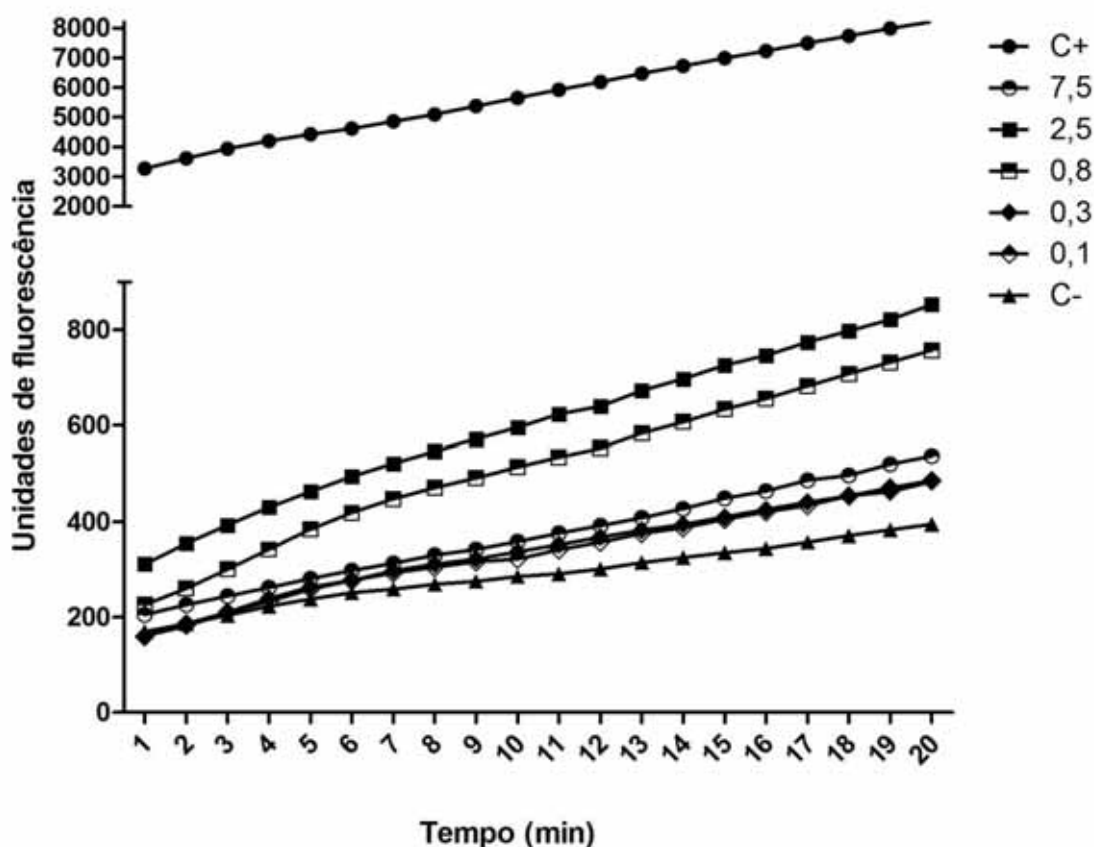


Figura 4. Cinética do extrato das folhas de *A. brachyphoda*, mostrando as unidades de fluorescência em função do tempo das cinco concentrações ($\mu\text{g/poço}$), controle positivo (10 nM de estradiol) e do controle negativo (DMSO a 10%).

4.2.2. Extrato etanólico do caule de *A. brachyphoda*

O extrato etanólico do caule de *A. brachyphoda* assim como no item anterior, foi avaliado quanto à atividade estrogênica através do teste com leveduras recombinantes (RYA), sendo utilizada a concentração inicial de 75mg/mL para realização dos três experimentos independentes realizados em triplicata. O extrato do caule não apresentou níveis detectáveis de estrogenicidade, todos os experimentos resultaram no cálculo de equivalentes de estradiol (EEQ) igual a zero. Os gráficos entre os valores de fluorescência em relação a concentração utilizada (Figura 5) e a cinética do experimento ao

comparar as unidades de fluorescência em relação ao tempo (Figura 6) foram elaborados para melhor visualização e comparação do resultados.

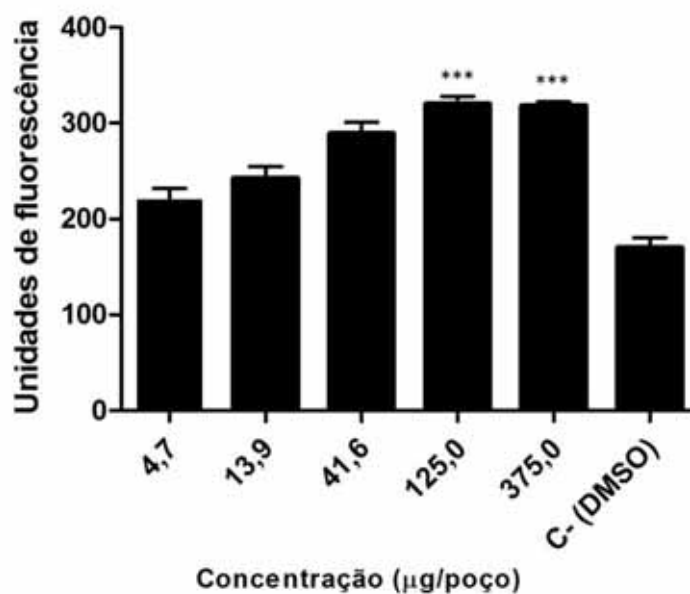


Figura 5. Atividade estrogênica, expressa em unidades de fluorescência, das diferentes concentrações testadas do extrato do caule de *A. brachyphoda*, utilizando a linhagem geneticamente modificada BY4741 de *S. cerevisiae*, sendo as médias das unidades de fluorescência do extrato comparadas com as do controle negativo (DMSO a 10%). Fluorescência do C+ ($17\text{-}\beta$ estradiol): 7273,0. *** $P < 0,0001$.

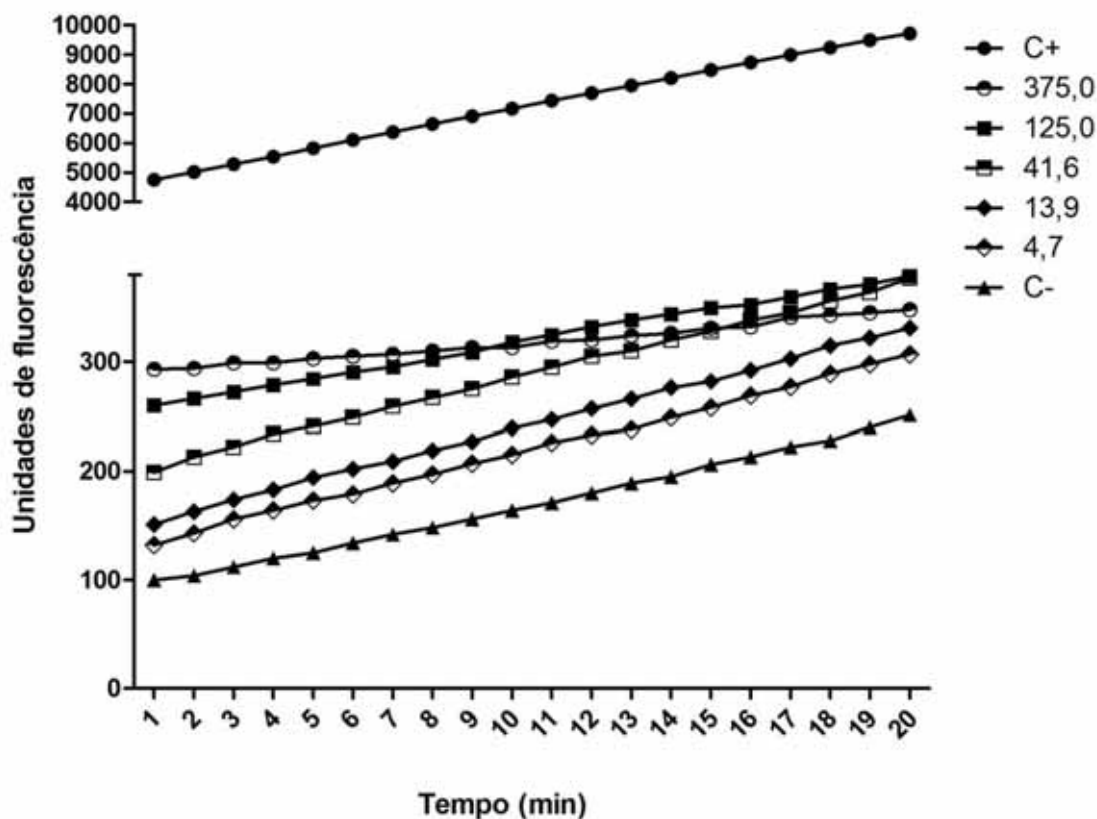


Figura 6. Cinética do extrato do caule de *A. brachyphoda*, mostrando as unidades de fluorescência em função do tempo das cinco concentrações ($\mu\text{g/poço}$), controle positivo (10 nM de estradiol) e do controle negativo (DMSO a 10%).

4.2.3. Extrato etanólico da raiz de *A. brachyphoda*

O extrato etanólico da raiz de *A. brachyphoda*, assim como nos dois itens anteriores, foi avaliado quanto à atividade estrogênica através do teste com leveduras recombinantes (RYA), sendo utilizada a concentração inicial de 1,5mg/mL para realização dos três experimentos independentes realizados em triplicata.

O cálculo de equivalentes de estradiol (EEQ), resultou numa média de $2,16\text{nM}\pm 0,90$ para o extrato de raiz e o EC_{50} obtido foi de 191,33g/mL. Os gráficos comparativos entre os valores de fluorescência em relação a concentração utilizada e da cinética do experimento através da comparação das unidades de fluorescência em relação ao tempo podem ser visualizados

nas Figuras 7 e 8 respectivamente e representam a atividade estrogênica avaliada através da atividade da enzima β -galactosidase pela medida das unidades de fluorescência.

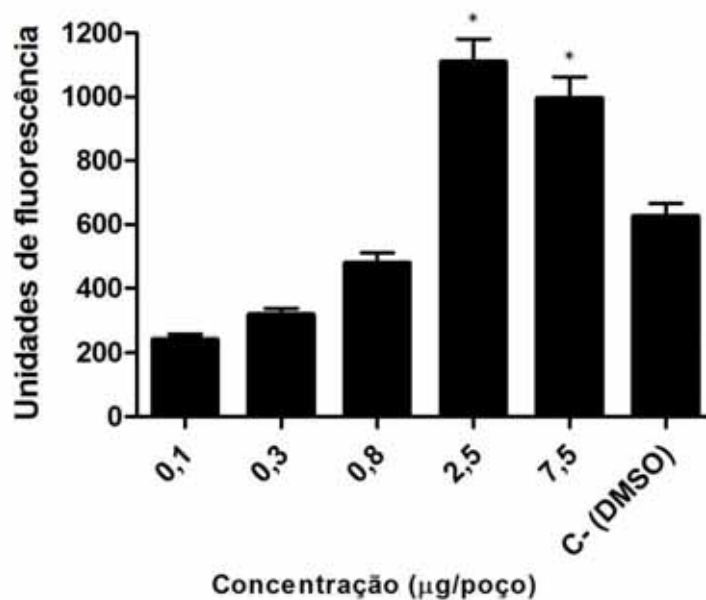


Figura 7. Atividade estrogênica, expressa em unidades de fluorescência, das diferentes concentrações testadas do extrato da raiz de *A. brachyphoda*, utilizando a linhagem geneticamente modificada BY4741 de *S. cerevisiae*, sendo as médias das unidades de fluorescência do extrato comparadas com as do controle negativo (DMSO a 10%). Fluorescência do C+ (17- β estradiol): 8056,0. ***P<0,0001.

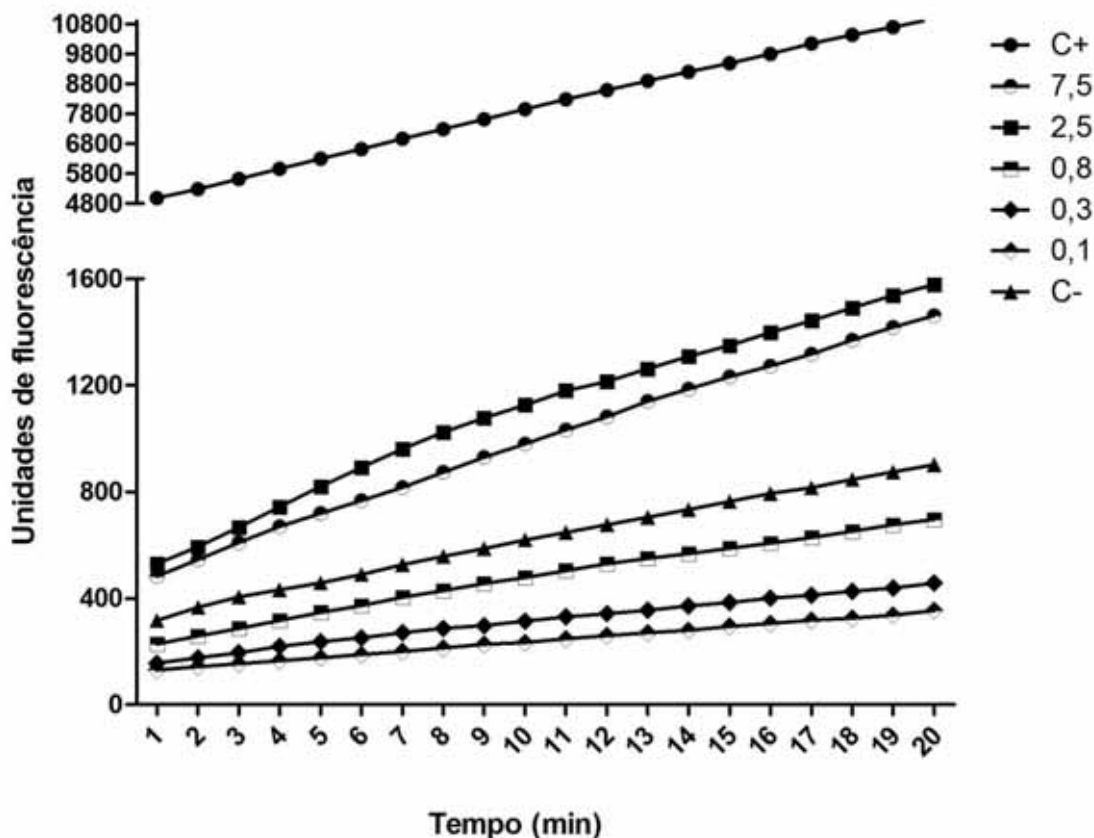


Figura 8. Cinética do extrato da raiz de *A. brachyphoda*, mostrando as unidades de fluorescência em função do tempo das cinco concentrações ($\mu\text{g/poço}$), controle positivo (10 nM de estradiol) e do controle negativo (DMSO a 10%).

4.2.4. Fração aquosa das folhas de *A. brachyphoda*

A fração aquosa do extrato das folhas também foi avaliada quanto à atividade estrogênica através do teste com leveduras recombinantes (RYA), sendo utilizada a concentração inicial de 7,5mg/mL para realização dos três experimentos independentes realizados em triplicata.

Todos os experimentos não detectaram atividade estrogênica, não sendo calculados equivalentes de estradiol (EEQ) ou EC_{50} para a fração testada. Os gráficos dos valores de fluorescência em relação à concentração utilizada (Figura 9) e a cinética do experimento, unidades de fluorescência em relação ao tempo, (Figura 10) podem observados abaixo.

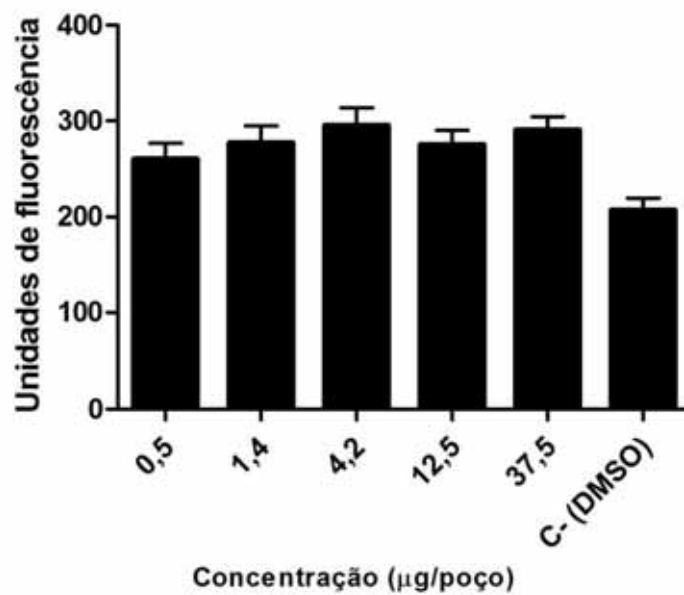


Figura 9. Atividade estrogênica, expressa em unidades de fluorescência, das diferentes concentrações testadas da fração aq. das folhas de *A. brachyphoda*, utilizando a linhagem geneticamente modificada BY4741 de *S. cerevisiae*, sendo as médias das unidades de fluorescência do extrato comparadas com as do controle negativo (DMSO a 10%). Fluorescência do C+ (17- β estradiol): 14350,0. ***P<0,0001.

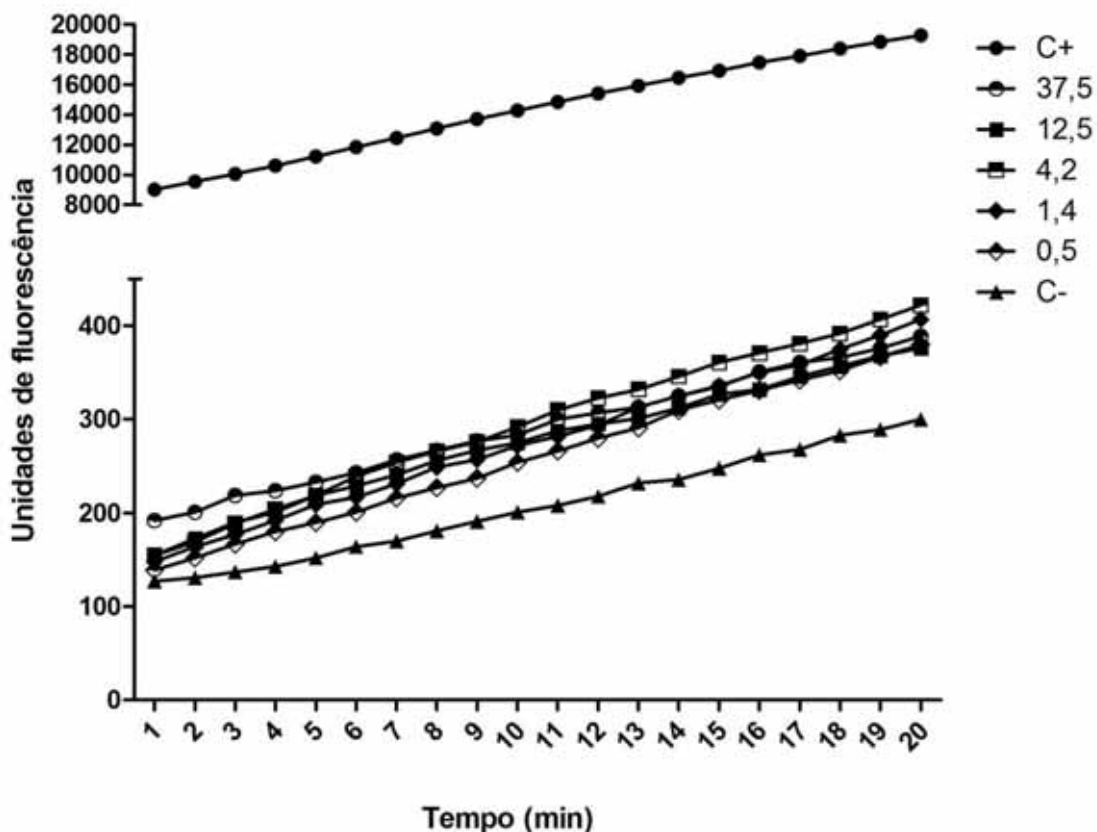


Figura 10. Cinética da fração aq. das folhas de *A. brachyphoda*, mostrando as unidades de fluorescência em função do tempo das cinco concentrações ($\mu\text{g/poço}$), controle positivo (10 nM de estradiol) e do controle negativo (DMSO a 10%).

4.2.5. Fração DCM das folhas de *A. brachyphoda*

A fração diclorometano do extrato das folhas, assim como no item anterior foi avaliada quanto à atividade estrogênica através do teste com leveduras recombinantes (RYA), testada na concentração inicial de 7,5mg/mL para realização dos três experimentos independentes realizados em triplicata. Todos os experimentos não detectaram atividade estrogênica para a fração DCM do extrato de folhas. Os gráficos das fluorescências obtidas em relação às concentrações utilizadas e da cinética do experimento podem observados nas figuras 11 e 12.

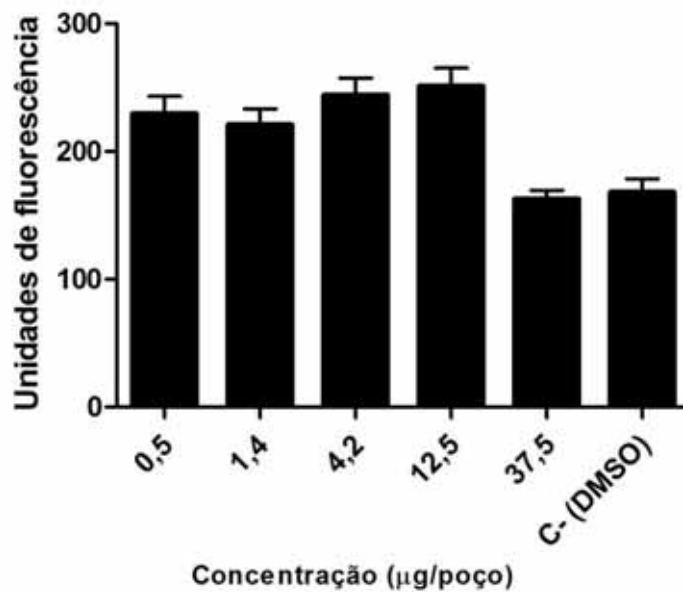


Figura 11. Atividade estrogênica, expressa em unidades de fluorescência, das diferentes concentrações testadas da fração DCM das folhas de *A. brachyphoda*, utilizando a linhagem geneticamente modificada BY4741 de *S. cerevisiae*, sendo as médias das unidades de fluorescência do extrato comparadas com as do controle negativo (DMSO a 10%). Fluorescência do C+ (17- β estradiol): 10822,0. ***P<0,0001.

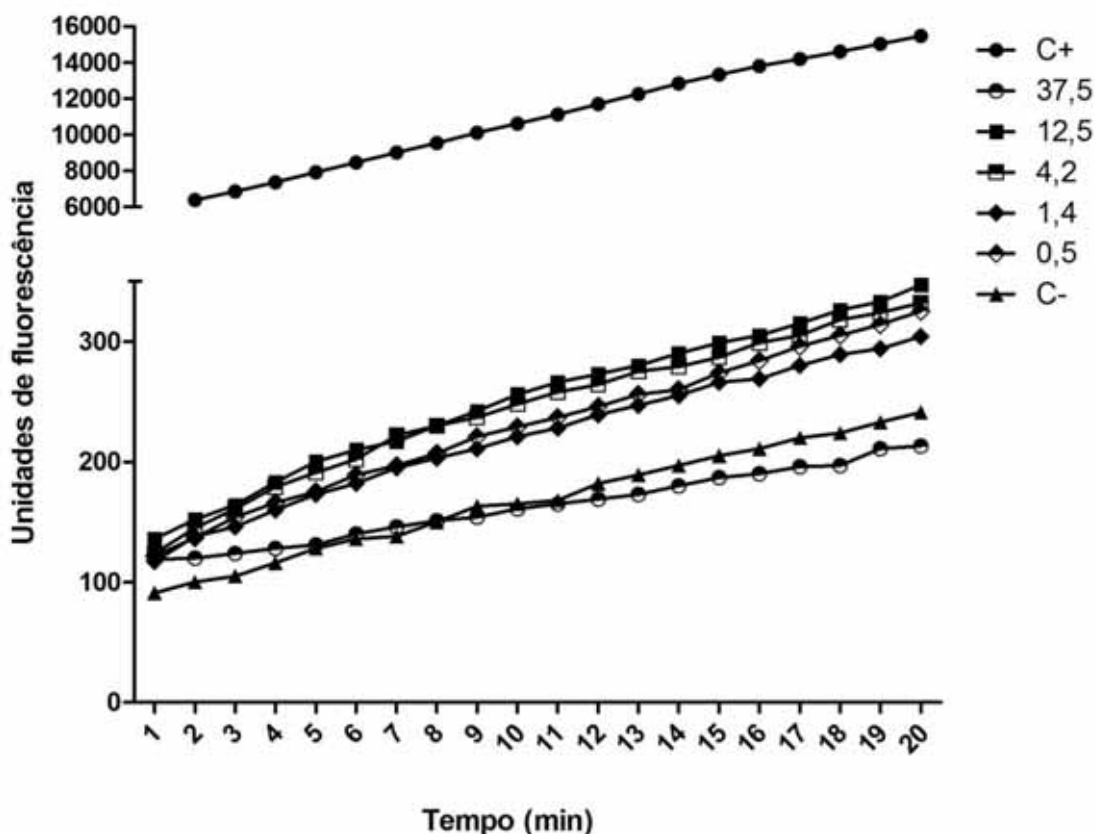


Figura 12. Cinética da fração DCM das folhas de *A. brachyphoda*, mostrando as unidades de fluorescência em função do tempo das cinco concentrações ($\mu\text{g/poço}$), controle positivo (10 nM de estradiol) e do controle negativo (DMSO a 10%).

4.2.6. Fração aquosa do caule de *A. brachyphoda*

A fração aquosa do extrato do caule, foi avaliada quanto à atividade estrogênica através do teste RYA, testada na concentração inicial de 7,5mg/mL para realização dos três experimentos independentes realizados em triplicata. Todos os experimentos com a amostra não obtiveram níveis detectáveis de estrogenicidade, ou seja, todos os resultados foram iguais a zero para o cálculo de equivalentes de estradiol. Os gráficos das fluorescências obtidas em relação às concentrações utilizadas e da cinética do experimento podem observados nas figuras 13 e 14.

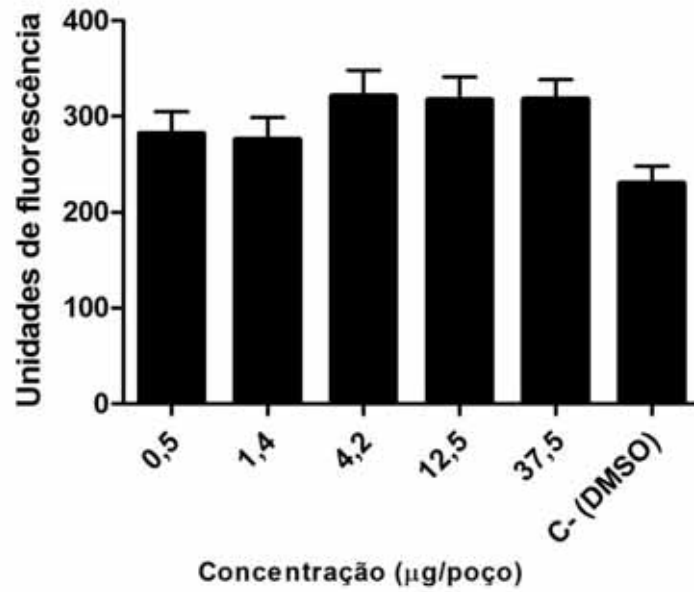


Figura 13. Atividade estrogênica, expressa em unidades de fluorescência, das diferentes concentrações testadas da fração aq. do caule de *A. brachyphoda*, utilizando a linhagem geneticamente modificada BY4741 de *S. cerevisiae*, sendo as médias das unidades de fluorescência do extrato comparadas com as do controle negativo (DMSO a 10%). Fluorescência do C+ (17- β estradiol): 13794,0. ***P<0,0001.

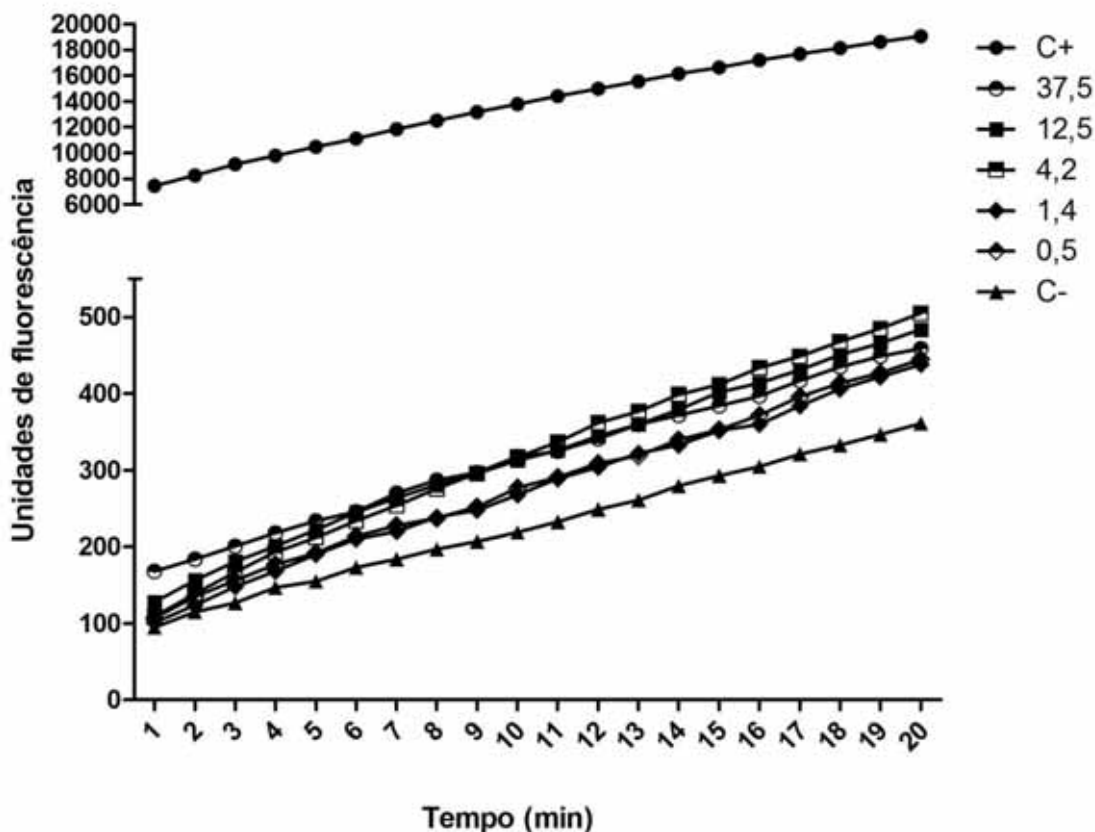


Figura 14. Cinética da fração aq. do caule de *A. brachyphoda*, mostrando as unidades de fluorescência em função do tempo das cinco concentrações ($\mu\text{g/poço}$), controle positivo (10 nM de estradiol) e do controle negativo (DMSO a 10%).

4.2.7. Fração DCM do caule de *A. brachyphoda*

A fração DCM do extrato do caule, foi avaliada quanto à atividade estrogênica através do teste RYA, testada na concentração inicial de 7,5mg/mL para realização dos três experimentos independentes realizados em triplicata. Todos os experimentos com a amostra não obtiveram níveis detectáveis de estrogenicidade. Os gráficos das fluorescências obtidas em relação às concentrações utilizadas e da cinética do experimento podem observados nas figuras 15 e 16.

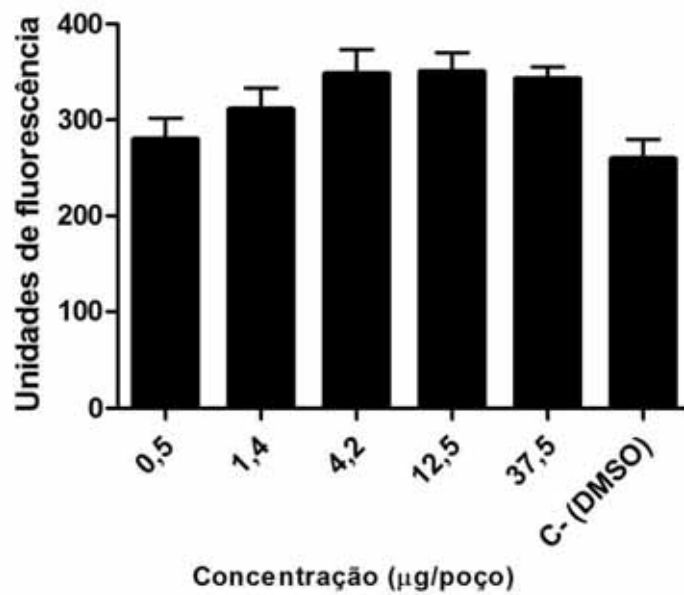


Figura 15. Atividade estrogênica, expressa em unidades de fluorescência, das diferentes concentrações testadas da fração DCM do caule de *A. brachyphoda*, utilizando a linhagem geneticamente modificada BY4741 de *S. cerevisiae*, sendo as médias das unidades de fluorescência do extrato comparadas com as do controle negativo (DMSO a 10%). Fluorescência do C+ (17- β estradiol): 15677,0. *** $P < 0,0001$.

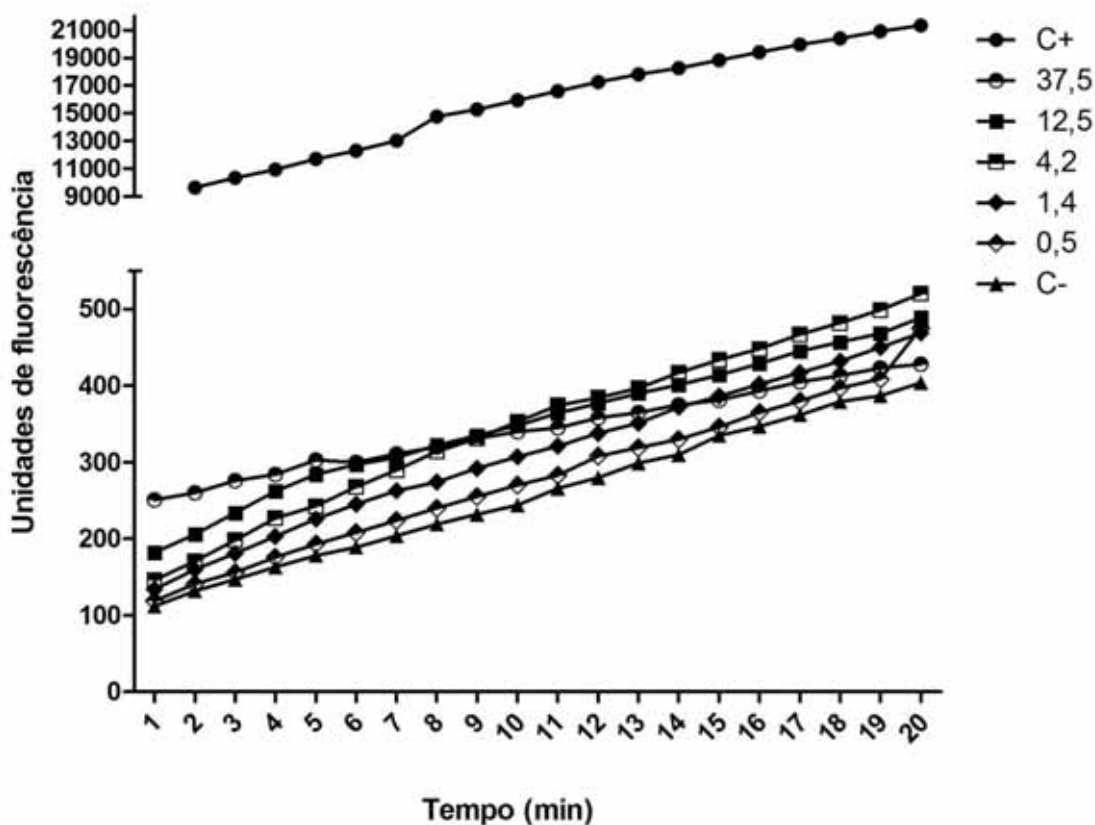


Figura 16. Cinética da fração DCM do caule de *A. brachyphoda*, mostrando as unidades de fluorescência em função do tempo das cinco concentrações ($\mu\text{g}/\text{poço}$), controle positivo (10 nM de estradiol) e do controle negativo (DMSO a 10%).

4.2.8. Fração aquosa da raiz de *A. brachyphoda*

A fração aquosa oriunda do extrato da raiz de *A. brachyphoda* também foi avaliada quanto sua estrogenicidade através do teste RYA, sendo testada na concentração inicial de 75mg/mL para realização dos três experimentos independentes realizados em triplicata. Assim como as frações anteriormente testadas, todos os experimentos realizados para esta fração não detectaram atividade estrogênica. Os gráficos das fluorescências obtidas em relação às concentrações utilizadas e da cinética do experimento podem ser observados nas figuras 17 e 18.

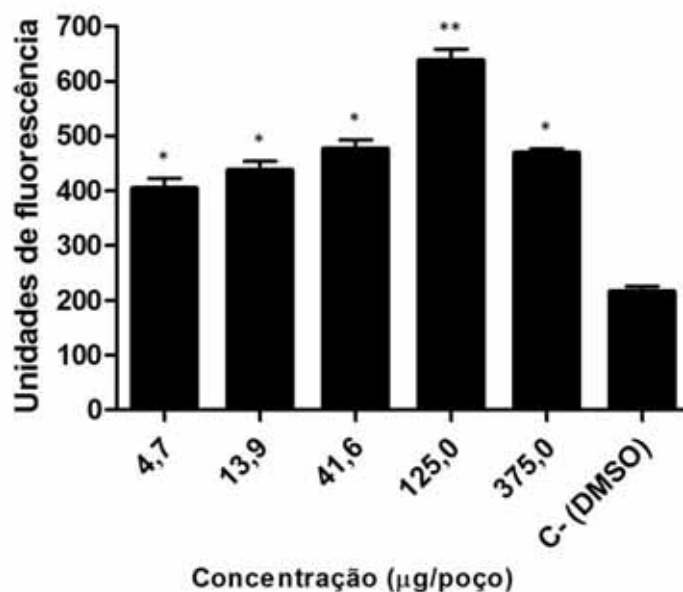


Figura 17. Atividade estrogênica, expressa em unidades de fluorescência, das diferentes concentrações testadas da fração aq. da raiz de *A. brachyphoda*, utilizando a linhagem geneticamente modificada BY4741 de *S. cerevisiae*, sendo as médias das unidades de fluorescência do extrato comparadas com as do controle negativo (DMSO a 10%). Fluorescência do C+ (17- β estradiol): 14874,0. ***P<0,0001.

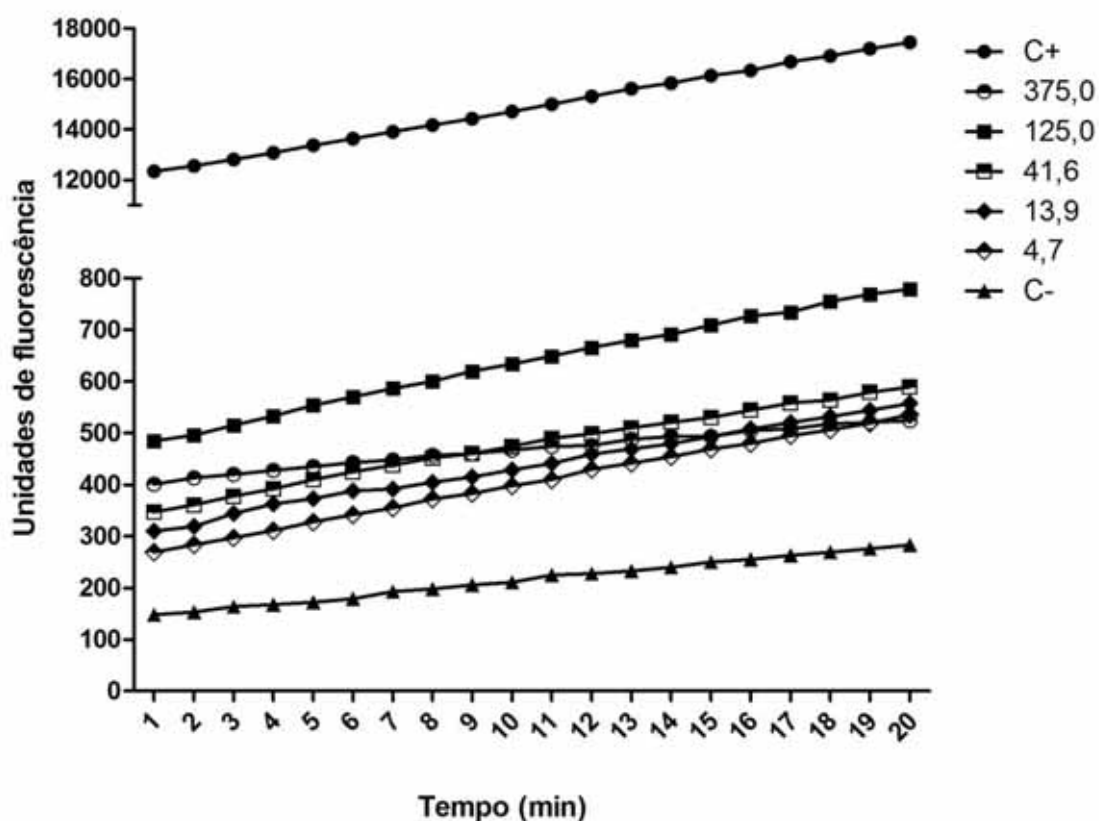


Figura 18. Cinética da fração aq. da raiz de *A. brachyphoda*, mostrando as unidades de fluorescência em função do tempo das cinco concentrações (µg/poço), controle positivo (10 nM de estradiol) e do controle negativo (DMSO a 10%).

4.2.9. Fração DCM da raiz de *A. brachypoda*

A fração diclorometano do extrato da raiz de *A. brachypoda* também foi avaliada quanto sua estrogenicidade através do teste RYA, sendo testada na concentração inicial de 75mg/mL para realização dos experimentos. Os três experimentos realizados em triplicata não níveis detectáveis de estrogenicidade para a fração DCM do extrato de raiz. Os gráficos das fluorescências obtidas em relação às concentrações utilizadas e da cinética do experimento podem observados nas figuras 19 e 20.

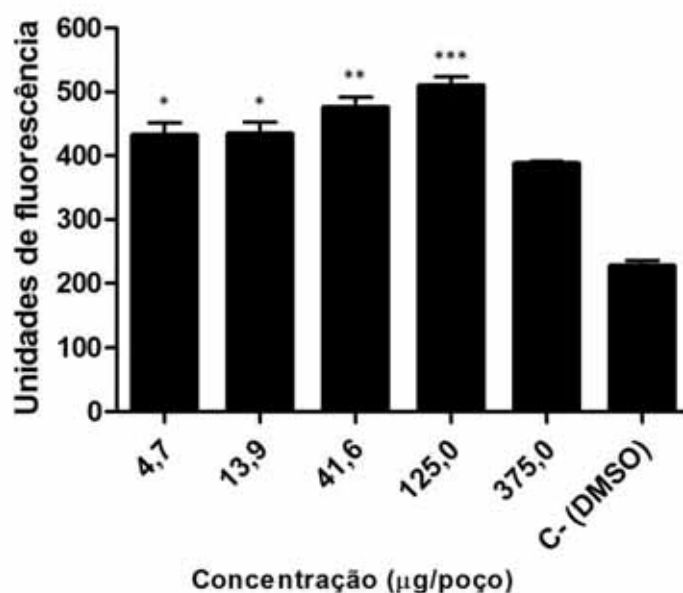


Figura 19. Atividade estrogênica, expressa em unidades de fluorescência, das diferentes concentrações testadas da fração DCM da raiz de *A. brachypoda*, utilizando a linhagem geneticamente modificada BY4741 de *S. cerevisiae*, sendo as médias das unidades de fluorescência do extrato comparadas com as do controle negativo (DMSO a 10%). Fluorescência do C+ ($17\text{-}\beta$ estradiol): 11810. *** $P < 0,0001$.

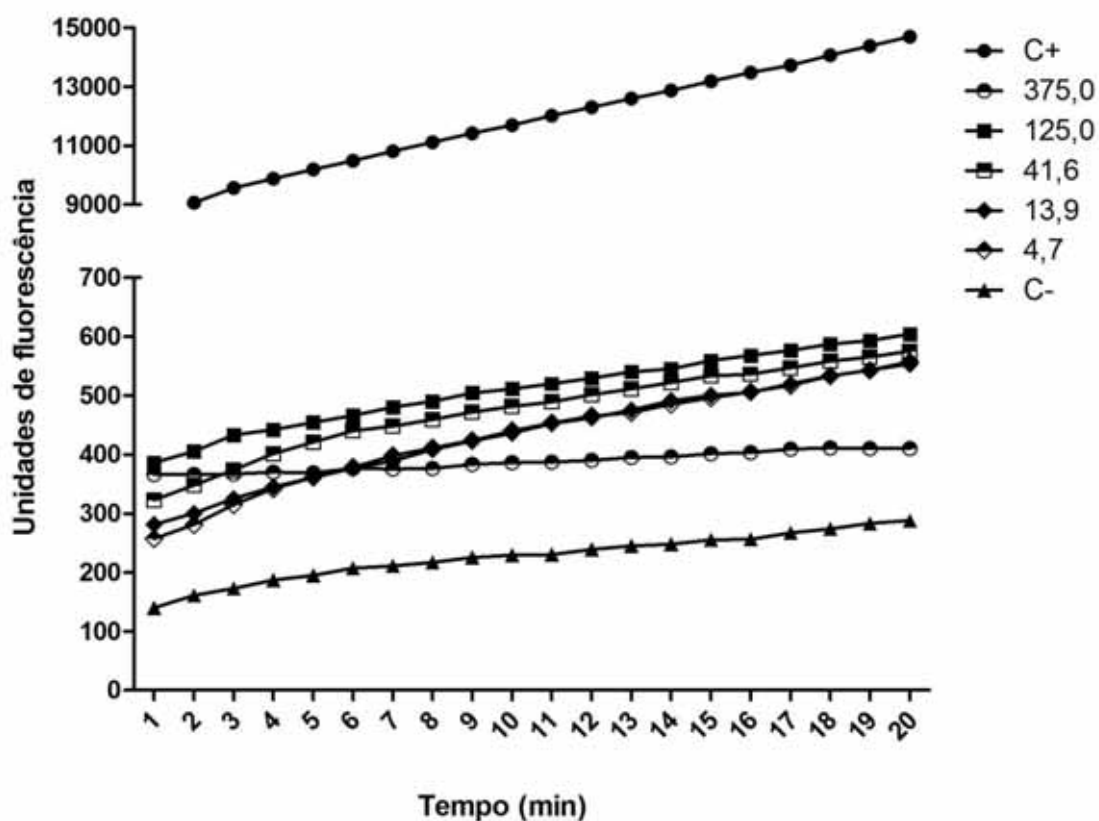


Figura 20. Cinética da fração DCM da raiz de *A. brachyphoda*, mostrando as unidades de fluorescência em função do tempo das cinco concentrações ($\mu\text{g}/\text{poço}$), controle positivo (10 nM de estradiol) e do controle negativo (DMSO a 10%).

4.2.10. Substâncias isoladas de *A. brachyphoda*

Os compostos isolados 1, 2 e 3 de *A. brachyphoda* foram avaliados quanto sua estrogênica através do teste RYA, na concentração inicial de 4,2; 4,0 e 4,4mg/mL para realização dos experimentos. Os três experimentos independentes realizados em triplicata não apresentaram níveis detectáveis de estrogênica para nenhuma das amostras testadas. Os gráficos das fluorescências obtidas em relação às concentrações utilizadas e da cinética do experimento podem observados nas figuras 21 e 22 (Subst. 01), 23 e 24 (Subst. 02) e 25 e 26 (Subst. 03).

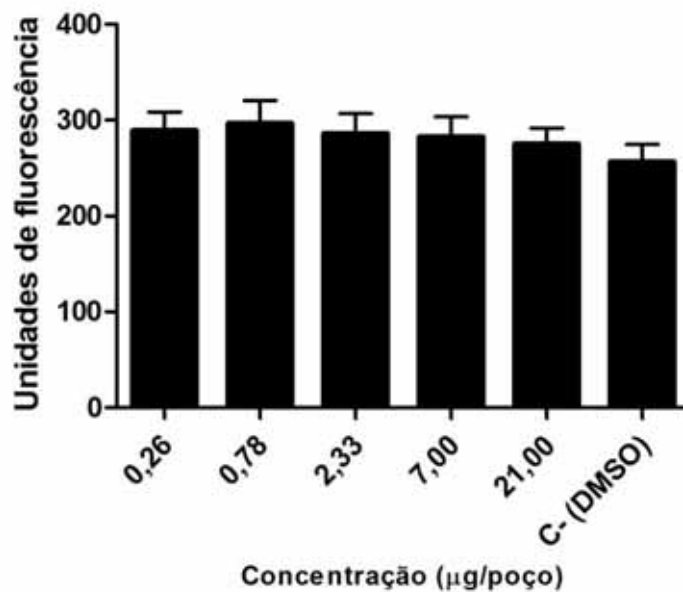


Figura 21. Atividade estrogênica, expressa em unidades de fluorescência, das diferentes concentrações testadas da subst.01 de *A. brachyphoda*, utilizando a linhagem geneticamente modificada BY4741 de *S. cerevisiae*, sendo as médias das unidades de fluorescência do extrato comparadas com as do controle negativo (DMSO a 10%). Fluorescência do C+ (17- β estradiol): 12579,0. ***P<0,0001.

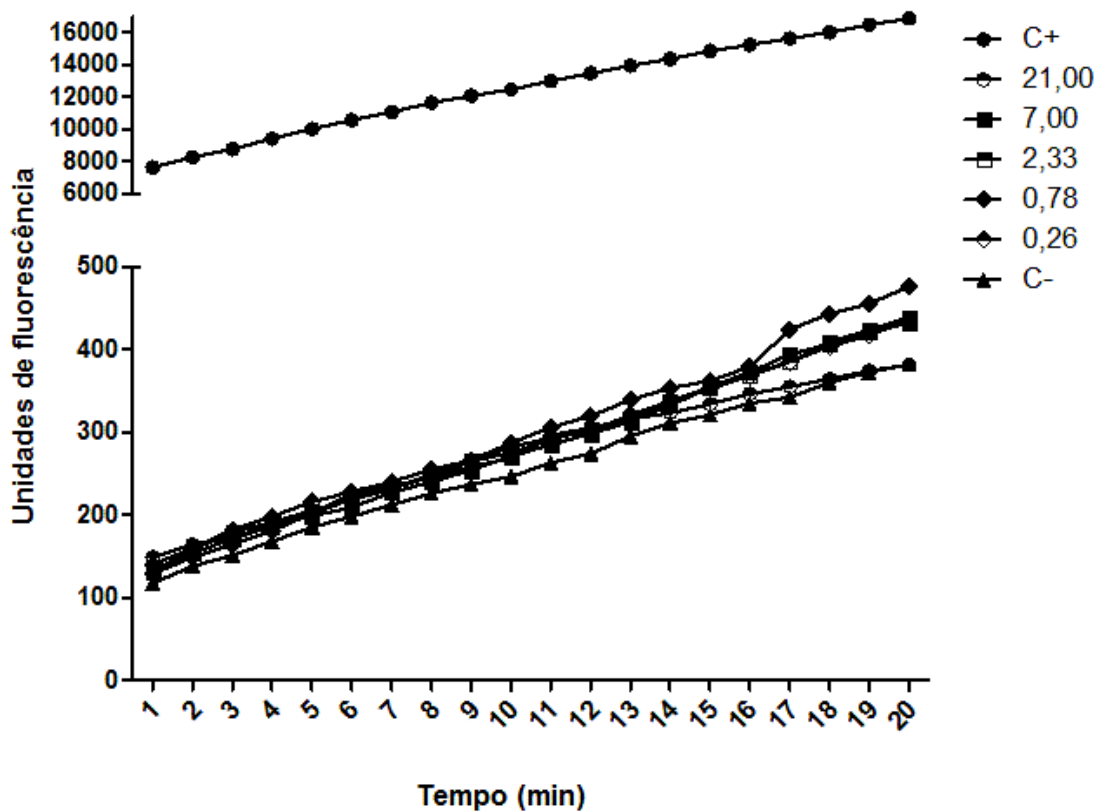


Figura 22. Cinética subst.01 de *A. brachyphoda*, mostrando as unidades de fluorescência em função do tempo das cinco concentrações (µg/poço), controle positivo (10 nM de estradiol) e do controle negativo (DMSO a 10%).

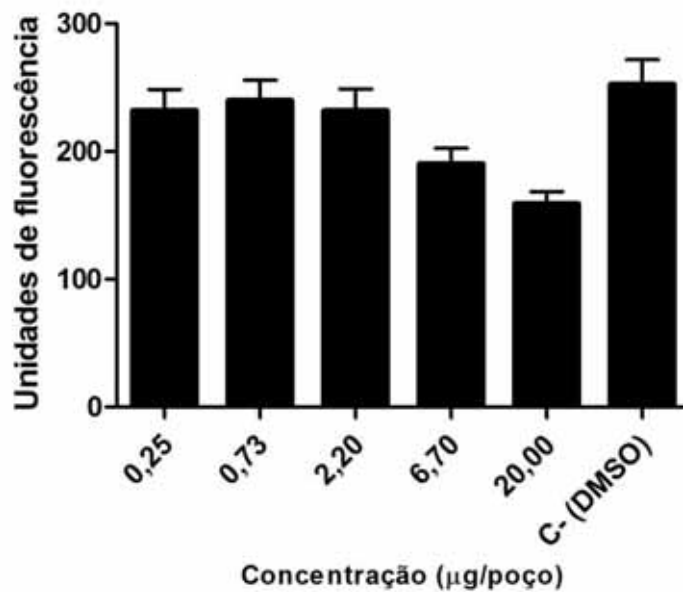


Figura 23. Atividade estrogênica, expressa em unidades de fluorescência, das diferentes concentrações testadas da subst.02 de *A. brachyphoda*, utilizando a linhagem geneticamente modificada BY4741 de *S. cerevisiae*, sendo as médias das unidades de fluorescência do extrato comparadas com as do controle negativo (DMSO a 10%). Fluorescência do C+ (17- β estradiol): 12443,0. ***P<0,0001.

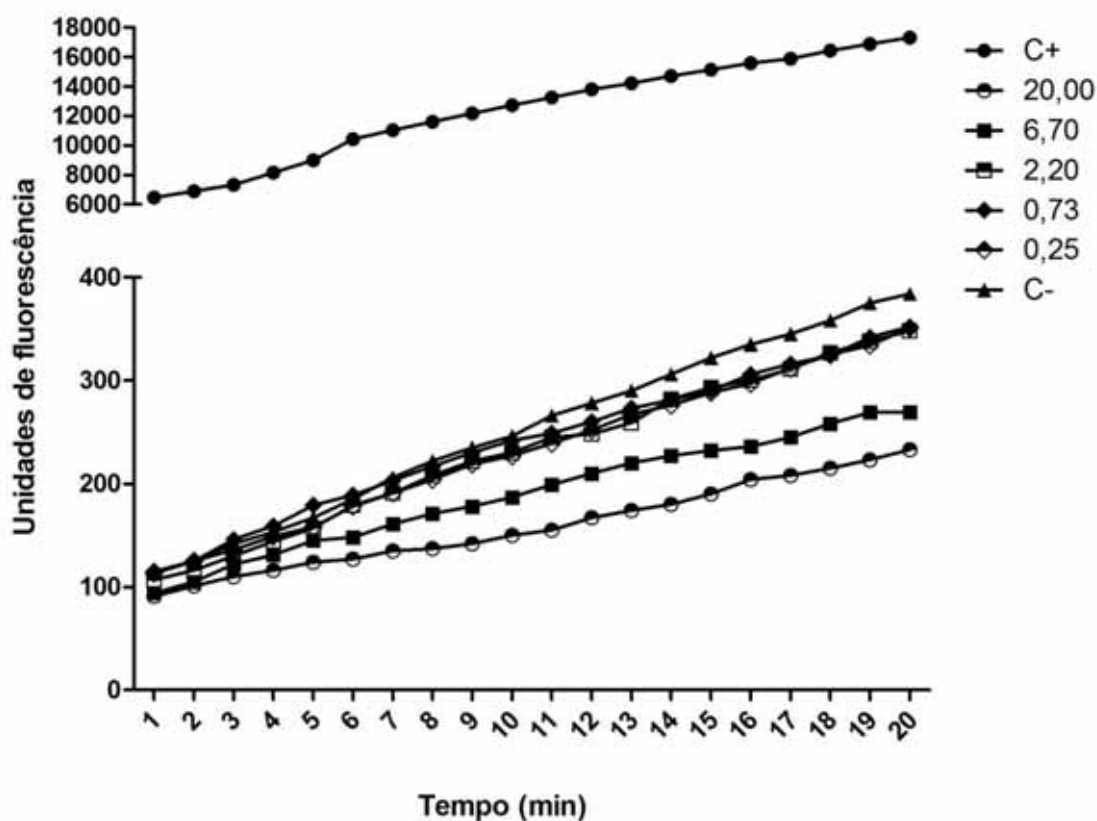


Figura 24. Cinética subst.02 de *A. brachyphoda*, mostrando as unidades de fluorescência em função do tempo das cinco concentrações (µg/poço), controle positivo (10 nM de estradiol) e do controle negativo (DMSO a 10%).

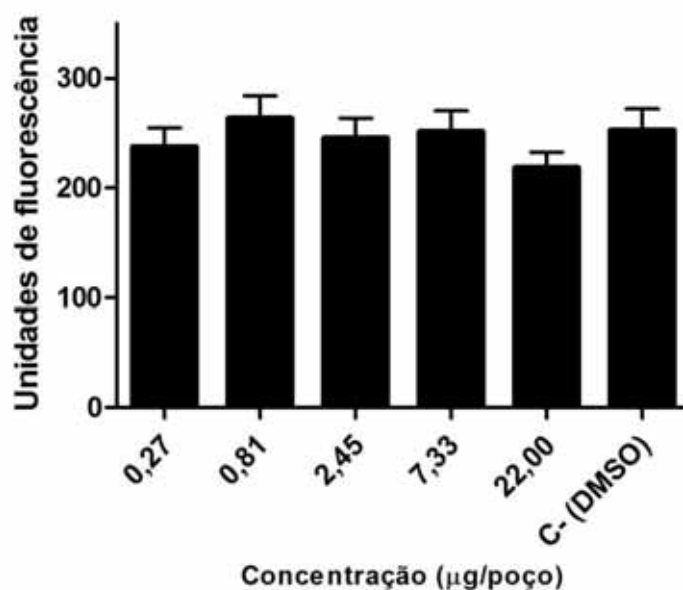


Figura 25. Atividade estrogênica, expressa em unidades de fluorescência, das diferentes concentrações testadas da subst.03 de *A. brachyphoda*, utilizando a linhagem geneticamente modificada BY4741 de *S. cerevisiae*, sendo as médias das unidades de fluorescência do extrato comparadas com as do controle negativo (DMSO a 10%). Fluorescência do C+ (17- β estradiol): 11683,00. ***P<0,0001.

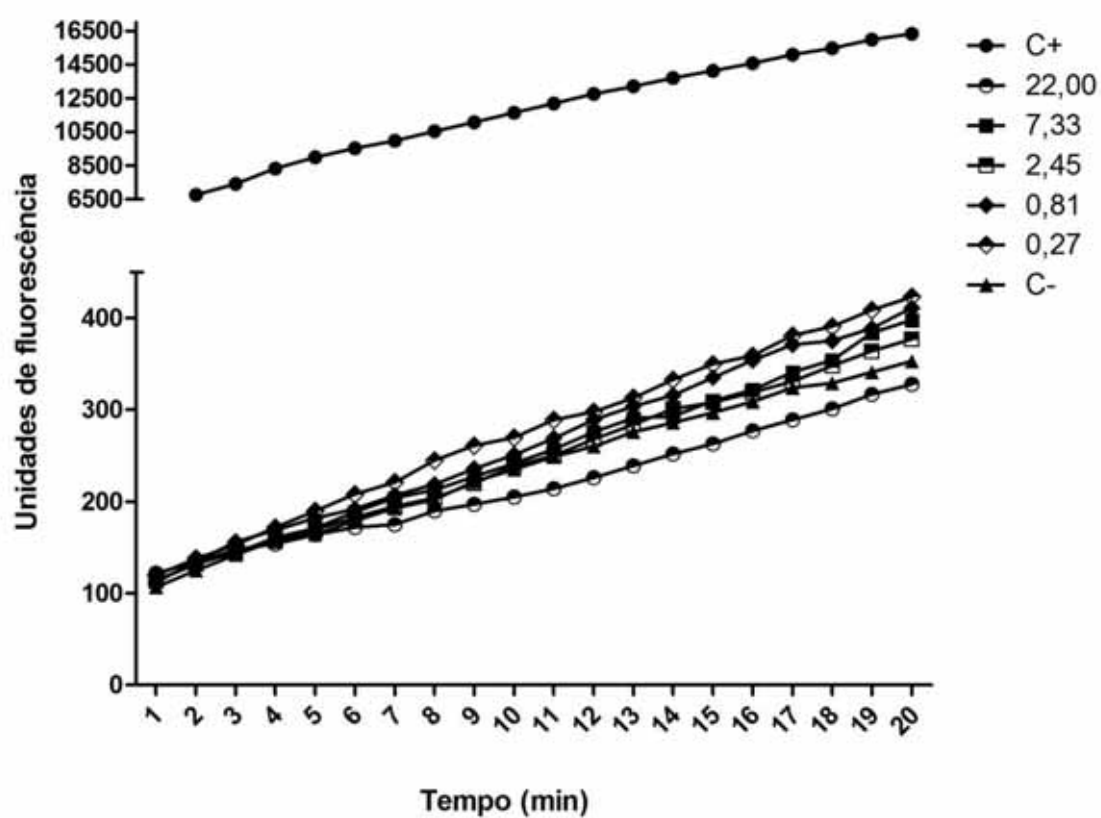


Figura 26. Cinética subst.03 de *A. brachyphoda*, mostrando as unidades de fluorescência em função do tempo das cinco concentrações (µg/poço), controle positivo (10 nM de estradiol) e do controle negativo (DMSO a 10%).

5. Discussão

5.1. Mutagenicidade

Considerando a falta de estudos sobre a segurança da *A. brachypoda*, apesar de seu uso na medicina popular e considerando que compostos mutagênicos são potencialmente perigosos para os seres humanos, esta investigação determinou os possíveis efeitos mutagênicos dos extratos das folhas, caule e raiz e suas respectivas frações aquosa e diclorometano por meio do teste de Ames, um ensaio de mutação reversa bacteriana utilizado mundialmente para determinar o potencial mutagênico de novos produtos químicos e drogas. Este método é muito rápido e econômico utilizado para identificar agentes potencialmente mutagênicos e para as substâncias que não são mutagênicas por si próprias, o teste de Ames inclui um sistema metabólico (mistura de enzimas do fígado S9) que possibilita a identificação de mutágenos de ação indireta, tornando-o assim um teste capaz de fornecer informações rápidas e confiáveis sobre o potencial de mutagenicidade. (CORNEJO-GARRIDO, 2015; ISSAZADEH et al., 2012; MAZZATORTA et al., 2007; MORTELMANS; ZEIGER, 2000).

Todos os extratos se apresentaram mutagênicos frente à linhagem TA98 de *S. typhimurium* através do Teste de Ames. O extrato das folhas foi o que apresentou índices mais expressivos de razão de mutagenicidade, sendo mutagênico para linhagem TA98 com e sem a necessidade de metabolização. O extrato de caule, assim como o de raiz, foram mutagênicos apenas para linhagem TA98 nos ensaios sem metabolização, mas mostraram indícios de mutagenicidade tanto para linhagem TA98 quanto na TA97a ambas na

presença da fração S9. Das frações testadas apenas com a linhagem TA98, somente a fração aquosa das folhas na ausência de metabolização apresentou-se mutagênica. As frações diclorometano tanto das folhas como das raízes na presença da fração S9 se mostraram com indícios de mutagenicidade.

Tais resultados mostram que o extrato das folhas age como um mutágeno direto, capaz de gerar mutações do tipo *frameshift* e também como um mutágeno indireto, ou seja produz produtos de derivados metabólitos capazes de gerar mutações também do tipo *frameshift*. Já os extratos de caule e de raiz além de serem mutágenos diretos, possuem indícios de causarem mutações também do tipo *frameshift*, mesmo após a metabolização através da fração S9, sendo possíveis mutágenos indiretos. A fração aquosa das folhas assim como os extratos testados também mostrou capacidade de agir como um mutágeno de ação direta através do mecanismo *frameshift* já as frações diclorometano das folhas e das raízes demonstraram indícios de ação como mutágenos indiretos também pelo mecanismo *frameshift*.

Apesar conhecimento fitoquímico limitado sobre a espécie *A. brachypoda*, tentamos relacionar os agentes químicos responsáveis por tal atividade. Blatt et al. (1998) descreveram a presença dos flavonoides apigenina e luteolina (Figura 5) no extrato das folhas de *A. brachypoda*. Alcerito et al. (2002) relataram a presença de quatro flavonoides na cera foliar de *A. brachypoda*: 3,4-dihidroxi-5,6,7-trimetoxiflavona, cirsilol, cirsimarina e a hispidulina (Figura 6). Da Rocha et al. (2011) descrevem de modo preliminar saponinas, glicosídeos cardíacos, compostos fenólicos, taninos, flavonoides como a quercetina (Figura 5), esteroides e os triperpenos pentacíclicos ácido

betulínico, ácido ursólico e ácido oleanólico (Figura 7) no extrato da raiz de *A. brachypoda*. Mais recentemente Da Rocha et al. (2014) isolaram três raros flavonoides diméricos também a partir da raiz de *A. brachypoda*, a brachydin A, brachydin B e brachydin C (Figura 8).

São características estruturais essenciais para a atividade mutagênica de flavonoides: um grupo hidroxila livre na posição 3 na estrutura de anel, uma ligação dupla na posição 2,3, (NAGAO et al., 1981) e um grupo ceto na posição 4 permitindo que o próton do grupo 3-hidroxila tautomerise na porção 3-ceto. Quando não há grupos hidroxila livres no anel B um sistema de ativação metabólico é necessário para a formação de um composto mutagênico (RIETJENS et al., 2005). A quercetina, molécula presente nas raízes de *A. brachypoda*, possui estrutura com todas essas características (Figura 5). Outras características de flavonoides que dependem da presença de grupos hidroxila nas posições 3' e 4' no anel B e a presença de um grupo hidroxila livre ou um grupo metoxila na posição 7 (anel A), também podem contribuir para que o composto seja mutagênico perante o teste de Ames (CZECZOT et al. 1990); essas características estruturais são exibidas pelos flavonoides hispidulina e luteolina, encontrados nas folhas de *A. brachypoda*.

Resende et al. (2012) apontam uma relação direta entre o padrão de hidroxilas presentes na molécula, como a quercetina que possui dois grupos hidroxila livres na posição orto no anel B e hidroxilas livres na posição 3, 5 e 7. Nenhuma das moléculas presentes em *A. brachypoda* possuem em sua estrutura hidroxilas livres na posição 3 do anel C, porém as moléculas dos flavonoides apigenina, luteolina e hispidulina, também encontradas nas folhas da espécie, possuem hidroxilas livres nas posições 5 e 7 do anel A.

Os flavonoides apigenina, luteolina, cirsilio e cirsimaritina não apresentam em sua estrutura hidroxila livre na posição 3 do anel C, mas apresentam dupla ligação entre as posições 2 e 3 e também a presença do grupo ceto na posição 4, além disso possuem hidroxilas livres em orto na posição 3',4' (cisiliol e luteolina), na posição 5 (apigenina, luteolina, cisiliol e cirsimaritina) e na posição 7 (apigenina e luteolina). O flavonoide 3',4'-dihidroxi5,6,7-trimetoxiflavona apresenta as características estruturais necessárias de possuir dupla ligação entre 2 e 3 no anel C e hidroxilas livres em orto na posição 3',4'.

Todas as moléculas presentes nas folhas de *A. brachypoda* descritas anteriormente (Figuras 5, 6, 8e 10) possuem características estruturais necessárias para apresentarem atividade mutagênica, o que explica a mutagenicidade acentuada encontrada nos extratos das folhas de *A. brachypoda*.

Das moléculas descritas nas raízes de *A. brachypoda*, podemos destacar a quercetina como um forte agente mutagênico; e os flavonoides brachyidin A, B e C, apesar de raros podem destacar: a presença de hidroxilas livres em R1, R4 e R5 em brachyidin A e C; e a presença de hidroxilas livres em R1 e R4 em brachyidin B. Apesar de nenhuma das moléculas possuírem hidroxila na posição orto, condição para mutagenicidade descrita por Resende et al. (2012), sabemos que a presença de hidroxilas livres é condição necessária para que a molécula seja um agente pro-oxidante. Por outro, lado os triperpenos pentacíclicos ácido betulínico, ursólico e oleanólico encontrados nas raízes de *A. brachypoda* possuem a capacidade de induzir a diferenciação

de células tumorais e a apoptose; e atuam em várias fases do desenvolvimento de tumores, inibindo a iniciação do tumor e sua promoção.

5.2. Estrogenicidade

Para o rastreio da atividade estrogênica, foram desenvolvidas uma série de ferramentas biológicas, dentre eles os bioensaios *in vitro* se destacam porque requerem poucos equipamentos e possuem altos níveis de sensibilidade. Foram desenvolvidos como ferramentas de rastreio rápido para a toxicidade de amostras ambientais e químicas. Entre estes bioensaios, o ensaio de leveduras recombinantes (RYA) tem sido aplicado com sucesso para a determinação da atividade estrogênica.

O teste RYA se baseia num organismo unicelular, uma levedura, geneticamente modificada (contendo o receptor de estrógeno humano e o gene lac Z que promove a expressão da enzima β -galactosidase) para provocar uma resposta fácil de ler após a exposição a estrógenos ou compostos semelhantes ao estrogênio, como os fitoestrógenos (CAMPBELL et al., 2006; SCHNELL et al., 2013; VERMEIRSSSEN et al., 2005).

Embora as pesquisas sobre os fitoestrógenos, em sua maioria, apontem para sua atuação positiva sobre a saúde humana, principalmente em mulheres no período da pós-menopausa como alívio dos fogachos (FERRARI, 2009), prevenção da atrofia vaginal (CHIECHI et al., 2003), redução do risco de câncer de mama (BUTLER et al., 2010; TROCK et al., 2006) entre outros, algumas pesquisas mostram essas substâncias como alteradores endócrinos com efeitos adversos para nossa saúde, como o estímulo do crescimento de células mamárias cancerosas (SAKAMOTO et al., 2009) hiperplasia endometrial

(UNFER et al., 2004) redução das concentrações plasmáticas de testosterona e atrofia das glândulas sexuais em ratos machos (CLINE et al.,2004). A *A. brachypoda* é uma planta popularmente utilizada no tratamento da arite e com diversas atividades biológicas descritas, por isso as amostras acima citadas tiveram seu potencial estrogênico avaliado através do teste RYA como um parâmetro toxicológico, ou seja, estudo de possíveis efeitos adversos e estabelecimento do uso seguro das amostras para o desenvolvimento de um possível fitoterápico de uso diário.

Apenas os extratos de folhas e das raízes apresentaram estrogenicidade, porém seus baixos valores de EEQ (7,37nM e 2,16nM) e altos valores de EC₅₀ (56,16g/mL e 191,33g/mL),respectivamente, demonstram seu baixo potencial fitoestrogênico quando comparados a outros dados publicados com produtos naturais, como o extrato etanólico das folhas de *Crotalaria pallida* com EEQ de 14,3nM e EC₅₀ de 0,2g/mL, sua fração diclorometano de EEQ= 89,0nM e EC₅₀=0,1g/mL e o estigmasterol (substância isolada de *C. pallida*) de EEQ=122,0nM e EC₅₀= 10,5x10⁻⁷g/mL (BOLDRIN et al.,2013); aos estrógenos naturais E2 (EC₅₀= 4x10⁻²µg/L ou 40ng/L), E3 (EC₅₀= 0,116µg/L ou 116ng/L) e E1 (EC₅₀=2,12µg/L ou 2120ng/L) e até mesmo quando comparados a amostras consideradas menos estrogênicas como os benzotiazoles com valores de EC₅₀ entre 5,5 e 7,8mg/L (CÉSPEDES et al.,2004). Klein e King (2007) alertam para as altas doses testadas, como por exemplo da genisteína que definem concentrações *in vitro* maior que 5µM como não-fisiológicas e, portanto, doses "altas", assim, muitos dos efeitos genotóxicos frequentemente citados de genisteína, incluindo a apoptose, a inibição da topoisomerase e outros, tornam-se menos evidentes reconsiderando as doses testadas.

No mercado as isoflavonas comerciáveis (**Buona**®) possuem conteúdo total de 60mg de isoflavonas por cápsula, apresentando níveis séricos máximos de $4,09 \pm 0,94$ mmol/L em $8,42 \pm 0,69$ horas para genisteína e de $3,14 \pm 0,36$ mmol/L em $7,42 \pm 0,74$ horas para daidzeína. Com a finalidade de comparação, os níveis séricos da genisteína são de 1,36g/mL, o que evidencia o baixo potencial dos resultados obtidos através dos extratos das folhas e das raízes da *A. brachyphoda* (EC_{50} de 56,16g/mL e 191,33g/mL respectivamente).

6. Conclusões

6.1. Potencial mutagênico

- Os extratos das folhas, caule e raiz de *A. brachypoda* foram capazes de induzir um aumento no número de colônias revertentes da linhagem TA98 de *S. typhimurium*, sendo considerados mutagênicos através do mecanismo *frameshift*.
- O extrato das folhas apresentou os maiores índices de aumento da taxa de reversão espontânea no experimentos com e sem metabolização com a linhagem TA98 de *S. typhimurium*, se comportando assim como um mutágeno direto e também indireto, produz produtos de derivados metabólitos que também são capazes de gerar mutação.
- O extrato do caule foi considerado capaz de induzir mutações diretas por ter apresentado RM maior que 2 apenas para a TA98 nos experimentos sem necessidade de metabolização, porém possui indícios de ser um mutágeno de ação indireta também através do mecanismo *frameshift*, devido aos seus resultados obtidos com as linhagens TA98 e TA97a realizados com metabolização.
- O extrato da raiz, assim como o do caule, foi considerado capaz de induzir mutações diretas por ter apresentado RM maior que 2 apenas para a TA98 nos experimentos sem metabolização, porém possui

indícios de ser um mutágeno de ação indireta através do mecanismo *frameshift*, devido aos seus resultados obtidos com as linhagens TA98 e TA97a realizados na presença da fração S9.

- Apenas a fração aquosa das folhas foi capaz de gerar mutações do tipo *frameshift*, sendo capaz de induzir um aumento no número das colônias revertentes de *S. typhimurium* da linhagem TA98 na ausência de metabolização, ou seja, é um mutágeno de ação direta.
- As frações DCM das folhas e da raiz foram consideradas com indícios de serem mutágenos indiretos pelo mecanismo *frameshift* de ação por apresentarem valores de mutagenicidade próximos a 2 e também relação dose-resposta.

6.2. Potencial estrogênico

- O extrato das folhas, testado pelo teste RYA, foi considerado estrogênico com EEQ de $7,37\text{nM}\pm 1,31$ e EC_{50} de $56,16\text{g/mL}$.
- O extrato do caule não apresentou níveis detectáveis de estrogenicidade, todos os experimentos resultaram no cálculo de EEQ iguais a zero.
- O extrato da raiz, testado através do teste RYA, foi considerado estrogênico com EEQ de $2,16\text{nM}\pm 0,90$ e EC_{50} de $191,33\text{g/mL}$.

- As frações aquosa e DCM dos extratos das folhas, caule e raízes não apresentaram níveis detectáveis de estrogenicidade.
- As substâncias 1, 2 e 3 também não apresentaram níveis detectáveis de estrogenicidade pelo teste RYA.

6.3. Conclusões gerais

A *Arrabidaea brachypoda*, apesar de ser utilizada popularmente no tratamento de dores nas articulações (artrite) e com comprovadas atividades biológicas, deve ser utilizada com cautela pois todos os extratos (folhas, caule e raízes) e também a fração aquosa oriunda do extrato das folhas, testados através do Teste de Ames foram considerados mutagênicos com taxas de reversão das colônias de *S. typhimurium* maiores que dois comparadas ao controle negativo.

A realização dos testes de RYA como um parâmetro toxicológico para o desenvolvimento de um possível fitoterápico de uso contínuo mostraram resultados positivos para atividade estrogênica, porém seus baixos índices nos permitem afirmar que o risco de efeitos adversos pela atuação como alteradores endócrinos é baixo. Outros ensaios (que não sejam de ligação competitiva ao receptor de estrógeno como o RYA) como ensaios de informação gênica, que determinam se a transcrição e tradução gênica são dependentes da interação do receptor de estrógenos com seu ligante; e de proliferação celular, que avaliam o aumento do número de células alvo durante a fase exponencial de proliferação devem ser realizados para confirmação da segurança do uso da *A. brachypoda* em relação à atividade estrogênica.

7. Referências bibliográficas

ALCERITO, T.; BARBO, F. E.; NEGRI, G.; SANTOS, D. Y. A. C.; MEDA, C. I.; YOUNG, M. C. M.; CHÁVEZ, D.; BLATT, C. T. T. Foliar epicuticular wax of *Arrabidaea brachypoda*: flavonoids and antifungal activity. *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 30, p. 677-683, 2002.

ALVARENGA, T. A.; BÊDO, T. R. F. O.; BRAGUINE, C. G.; GONÇALVES, U. O.; MAGALHÃES, L. G.; RODRIGUES, V.; GIMENEZ, V. M. M.; GROppo, M.; SILVA, M. L. A.; CUNHA, W. R.; JANUÁRIO, A. H.; PAULETTI, P. M. PAULETTI. Evaluation of *Cuspidaria pulchra* and its Isolated Compounds Against *Schistosoma mansoni* Adult Worms. *International Journal of Biotechnology for Wellness Industries*, v. 1, p. 122-127, 2012.

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

BARBOSA, W. L. R.; PINTO, L. N.; QUIGNARD, E.; VIEIRA, J. M. S.; SILVA JR, J. O. C.; ALBUQUERQUE, S. *Arrabidaea chica* (HBK) Verlot: phytochemical approach, antifungal and trypanocidal activities. *Rev Bras Farmacogn*, v.18, p.544-548, 2008.

BERNI, N. I. O.; LUZ, M. H.; KOHLRAUSCH, S. C. Conhecimento, percepções e assistência à saúde da mulher no climatério. *Revista Brasileira de Enfermagem*, Brasília, v. 60, n. 3, p. 299-306, 2007.

BERNSTEIN L.; KALDOR J.; MCCANN J.; PIKE M. C. An empirical approach to the statistical analysis of mutagenesis data from the *Salmonella* test. *Mutat Res*, v. 97, p.267–281, 1982.

BLATT, C. T. T.; SANTOS, M. S.; SALATINO, A. Flavonoids of Bignoniaceae from the “cerrado” and their possible taxonomic significance. *Pl. Syst. Evol.*, v. 210, p.289–292, 1998.

BOLDRIN , P. K.; RESENDE, F. A.; OLIVEIRA-HÖHNE, A. P.; DE CAMARGO, M. S.; ESPANHA, L. G.; NOGUEIRA, C. H.; MELO, M. S. F.; VILEGAS, W.; VARANDA, E. A. Estrogenic and mutagenic activities of *Crotalaria pallida* measured by recombinant yeast assay and Ames test. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, v.13, p.216, 2013.

BRANDÃO, G. C.; KROON, E. G.; DOS SANTOS, J. R. ; STEHMANN, J.R. ; LOMBARDI, J.A. ; BRAGA DE OLIVEIRA, A. Antiviral activity of Bignoniaceae species occurring in the State of Minas Gerais (Brazil): part 1. *Letters in Applied Microbiology*, v.51, p.469–476, 2010.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RESOLUÇÃO - RDC No - 69, DE 8 DE DEZEMBRO DE 2014. **Diário Oficial [da] República Federativa**

do Brasil, Brasília, DF, 9 dez. 2014. Disponível em

<http://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?data=09/12/2014&jornal=1&pagina=43&totalArquivos=92> Acesso em 13/02/2015.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos. Brasília, DF, 31 jan. 2013. Disponível em <
<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/e0f1d9004e6248049d5fddd762e8a5ec/Guia+de+Estudos+N%C3%A3o+Cl%C3%ADnicos+-+vers%C3%A3o+2.pdf?MOD=AJPERES>> Acesso em 07/04/2015.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção a Saúde. Departamento de Ações Programáticas Estratégicas. *Manual de Atenção a Mulher no Climatério/Menopausa*. Brasília, 2008.

BUONA: cápsulas. Responsável técnico Dra. Sônia Albano Badaró. São Paulo: EUROFARMA, 2014. Bula de remédio.

BUTLER, L. M.; WU, A. H.; WANG, R.; KOH, W. P.; YUAN, J. M.; YU, M. C. A vegetable-fruit-soy dietary pattern protects against breast cancer among postmenopausal Singapore Chinese women. *Am. J. Clin. Nutr.*, v.91, p.1013-9, 2010.

CALIXTO, J. B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: A personal view. *Journal of Ethnopharmacology*. v.100, p.131–134, 2005.

CAMPBELL, C. G.; BORGLIN, S. E.; GREEN, F. B.; GRAYSON, A.; WOZEI, E.; STRINGFELLOW, W. T. Biologically directed environmental monitoring, fate, and transport of estrogenic endocrine disrupting compounds in water: A review. *Chemosphere*, v.65, p.1265–1280, 2006.

CÉSPEDES, R.; PETROVIC, M.; RALDU, D.; SAURA, U.; PINA, B.; LACORTE, S.; VIANA, P.; BARCELÓ, D. Integrated protocol for the determination of endocrine disrupting activity in the surface waters and sediments using biological techniques by recombinant yeast assay and chemical analysis by LC-ESI-MS. *Anal. Bioanal. Chem.* V.378, p.697–708, 2004.

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

CHIECHI, L. M.; PUTIGNANO, G.; GUERRA, V.; SCHIAVELLI, M. P.; CISTERNINO A. M.; CARRIERO, C. The effect of a soy rich diet on the vaginal epithelium in postmenopause: a randomized double blind trial. *Maturitas*, v.45, p.241-6, 2003.

CORNEJO-GARRIDO, J.; SALINAS-SANDOVAL, M.; DÍAZ-LÓPEZ, A.; JÁCQUEZ-RÍOS, P.; ARRIAGA-ALBAA, M.; ORDAZ-PICHARDO, C. In vitro and in vivo antifungal activity, liver profile test, and mutagenic activity of five plants used in traditional Mexican medicine. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.25, 2015.

CLINE, J. M.; FRANKE, D. A.; REGISTER, T. C.; GOLDEN, D. L.; ADAMS, M. R. Effects of Dietary Isoflavone Aglycones on the Reproductive Tract of Male and Female Mice. *Toxicologic Pathology*, v.32, p.91–99, 2004.

CZECZOT, H.; TUDEK, B.; KUSZTELAK, J.; SZYMCZYK, T.; DOBROWOLSKA, B.; GLINKOWSKA, G.; MALINOWSKI, J.; STRZELECKA, H. Isolation and studies of the mutagenic activity in the Ames test of flavonoids naturally occurring in medical herbs. *Mutat. Res.*, v.240, p.209-216, 1990.

Da ROCHA, C. Q. VILELA, F. C.; CAVALCANTE, G. P.; SANTA-CECÍLIA, F. V.; SANTOS E SILVA, L.; dos Santos, M. H.; Giusti-Paiva, A. Anti-inflammatory and antinociceptive effects of *Arrabidaea brachypoda* (DC.) Bureau roots. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 133, n. 2, p. 396-401, 2011.

Da ROCHA, C. Q.; QUEIROZ, E. F.; MEIRA, C. S.; MOREIRA, D. R. M.; SOARES, M. B. P.; MARCOURT, L.; VILEGAS, W.; WOLFENDER, J. L. Dimeric Flavonoids from *Arrabidaea brachypoda* and Assessment of Their Anti-*Trypanosoma cruzi* Activity. *Journal of Natural Products*, v.77, p.1345–1350, 2014.

De ANGELIS, R. C. de. Importância de alimentos vegetais na proteção da saúde: fisiologia da nutrição protetora e preventiva de enfermidades degenerativas. *Atheneu*. p. 295, 2001.

FERRARI, A. Soy extract phytoestrogens with high dose of isoflavones for menopausal symptoms. *J. Obstet Gynaecol Res*, v.35, p.1083-90, 2009.

FERRO, D. Fitoterapia: conceitos clínicos. São Paulo: Ed, Atheneu, 2006.

GAIKWAD, S. B.; MOHAN, K. G.; RANI, S. M. Phytochemicals for Diabetes Management. *Pharmaceutical Crops*, v.5, p.11-28, 2014.

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

GIACOMINI D. R.; MELLA E. A. C. Reposição hormonal: vantagens e desvantagens. *Semina Ciênc Biol Saúde*, Londrina, v. 27, n. 1, p. 71-92, 2006.

GONZÁLEZ, B.; SUAREZ-ROCHA, H.; BRAVO, A.; SALAS-AUVERT, R.; ÁVILA, D. Chemical composition and biological activity of extracts from *Arrabidaea bilabiata*. *Pharm. Biol.* V.38: p.287–290, 2000.

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

HAUSCHILD, L.; LOVATTO, P. A.; LEHNEN, C. R.; CARVALHO, A. A.;
GARCIA, G. G.; MALLMANN, C. A. Digestibilidade e metabolismo de dietas de
suínos contendo zearalenona com adição de organoaluminossilicato. *Pesq.
agropec. bras.*, Brasília, v.42, n.2, p.219-224, 2007.

HÖFLING, J. F.; ANÍBAL, P. C.; OBANDO-PEREDA, G. A.; PEIXOTO, I. A.;
FURLETTI, V. F.; FOGLIO, M. A.; Gonçalves, R. B. Antimicrobial potential of
some plant extracts against *Candida* species. *Braz. J. Biol.* V.70, p.1065–1068,
2010.

ISSAZADEH, K.; ALIABADI, M. A.; DARSANAKI, R. K.; PAHLAVIANI, M. R. M.
K. Antimutagenic Activity of Olive Leaf Aqueous Extract by Ames Test.
Advanced Studies in Biology, v. 4, p.397 – 405, 2012.

JORGE, M. P.; MADJAROF, C.; RUIZ, A. L. T. G.; FERNANDES, A. T.;
RODRIGUES, R. A. F.; DE OLIVEIRA SOUZA; I. M.; FOGLIO; M. A.; DE
CARVALHO, J. E. Evaluation of wound healing properties of *Arrabidaea chica*
Verlot extract. *J. Ethnopharmacol*, v.118, p. 361–366, 2008.

KLEIN, C. B.; KING, A. A. Genistein genotoxicity: Critical considerations of in vitro exposure dose. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v.224, p.1–11, 2007.

LEITE, J. P. V.; OLIVEIRA, A. B.; LOMBARDI, J. A.; FILHO, J. D. S.; CHIARI, E. Trypanocidal Activity of Triterpenes from *Arrabidaea triplinervia* and derivatives. *Biol. Pharm. Bull.* 29: 2307-2309, 2006.

LIMA, C. S. A.; DE AMORIM, E. L. C.; FONSECA, K. X. R. S.; CHIAPPETA, A. A.; NUNES, X. P.; AGRA, M. F.; DA CUNHA, E. V. L.; SILVA, M. S.; BARBOSA-FILHO, J. M. Antimicrobial activity of a mixture of two isomeric phenylpropanoid glycosides from *Arrabidaea harleyi* A.H. Gentry (Bignoniaceae). *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 39, n. 1, 2003.

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

MAZZATORTA, P.; TRAN, L. A.; SCHILTER, B.; GRIGOROV, M. Integration of structure-activity relationship and artificial intelligence systems to improve in silico prediction of Ames test mutagenicity. *J Chem Inf Mod*, v. 47, p. 34-38, 2007.

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

NAGAO, M.; MORITA, N.; YAHAGI, T.; SHIMIZU, M.; KUROYANAGI, M.; FUKUOKA, M.; YOSHIHIRA, K.; NATORI, S.; FUJINO, T.; SUGIMURA, T. Mutagenicities of 61 flavonoids and 11 related compounds. *Environ. Mutagen.*, v. 3, n. 4, p. 401-419, 1981.

NAHÁS E. A. P. et al. Efeitos da isoflavona sobre os sintomas climatéricos e o perfil lipídico na mulher em menopausa. *Rev Bras Ginecol Obstet.*, v. 25, n. 5, p. 337-343, 2003.

NASCIMENTO, V. T., LACERDA, E. U., MELO, J. G., LIMA, C. S. A., AMORIM, E. L. C., ALBUQUERQUE, U. P. Controle de qualidade de produtos à base de plantas medicinais comercializados na cidade do Recife-PE: erva-doce (*Pimpinella anisum* L.), quebra-pedra (*Phyllanthus* spp.), espinheira santa (*Maytenus ilicifolia* Mart.) e camomila (*Matricaria recutita* L.). *Rev.Bras.pl.med.* v.7, n.3, p.56-64, 2005.

NOGUEROL, T. N.; BORONAT, S.; CASADO, M.; RALDÚA, D.; BARCELÓ, D.; PIÑA, B. Evaluating the interactions of vertebrate receptors with persistent pollutants and antifouling pesticides using recombinant yeast assays. *Anal Bioanal Chem.*, v. 385, p. 1012-19, 2006.

North American Menopause Society. Recommendations for estrogen and progestogen use in peri-and postmenopausal women: October 2004 position statement of The North American Menopause Society.

OLIVEIRA, A. B.; RASLAN, D. S.; MIRAGLIA, M. C. M.; MESQUITA, A. A. L.; ZANI, C. L.; FERREIRA, D. T.; MAIA, J. G. S. Estrutura química e atividade biológica de naftoquinonas de Bignoniaceas brasileiras. *Quím. Nova*, v. 13, p. 302–307, 1990.

OLIVEIRA, D. P. C.; BORRAS, M. R. L.; FERREIRA, L. C. L.; LÓPEZ-LOZANO, J. L. Atividade antiinflamatória do extrato aquoso de *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) B. Verl. Sobre o edema induzido por venenos de serpentes amazônicas. *Braz. J. Pharmacog*, v.19, p.643–649, 2009.

Organização Mundial da Saúde. Mensagem do Diretor Regional da OMS para África, Dr. Luis Gomes Sambo, por ocasião do Dia da Medicina Tradicional Africana, 31 de Agosto de 2011 <<http://www.afro.who.int/pt/rdo/discursos/3280-mensagem-por-ocasio-do-dia-da-medicina-tradicional-africana-31-de-agosto-de-2011.html>>. Acesso em 13/02/2015

PAULETTI, P. M.; BOLZANI, V. S.; YOUNG, M. C. M. Constituintes químicos de *Arrabidaea samydoides* (Bignoniaceae). *Quim. Nova*, Vol. 26, No. 5, 641-643, 2003.

PETROVSKA, B. B. Historical review of medicinal plants' usage. *Pharmacogn Rev*, v.6(11), 2012.

PIRBALOUTI, G. A.; MOMENI, M.; BAHMANI, M. Ethnobotanical study of medicinal plants used by Kurd tribe in Dehloran and Abdanan districts, Ilam province, Iran. *Afr J Tradit Complement Altern Med.*, v. 10, p.368-000, 2013.

PREDIGER, C. C. Efeitos do Consumo da Proteína de Soja Isolada sobre os Níveis de Lipídios Séricos nas Mulheres. Tese de Doutorado. Porto Alegre 2009. Disponível em www.lume.ufrgs.br. Acesso em: 24/02/2014.

RESENDE, F. A.; VILEGAS, W.; DOS SANTOS, L. C.; VARANDA, E. A. Mutagenicity of Flavonoids Assayed by Bacterial Reverse Mutation (Ames) Test. *Molecules*, v.17, p.5255-5268, 2012.

RIBEIRO, L. M. Aspectos etnobotânicos numa área rural – São João da Cristina, MG. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal do Rio de Janeiro/ Museu Nacional, Rio de Janeiro. 1996.

RICARDO, O. Disponível em:

<<https://www.flickr.com/photos/12389332@N08/4269530844/in/set-72157623072166349>>. Acesso em Jan. 2015.

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

SAKAMOTO, T.; HORIGUCHI., H.; OGUMA, E.; KAYAMA, F. Effects of diverse dietary phytoestrogens on cell growth, cell cycle and apoptosis in estrogen-receptor-positive breast cancer cells. *J Nutr Biochem*, v.21, p.856-64, 2009.

SANTOS, F. V. Avaliação da mutagenicidade *in vivo* e *in vitro* de compostos obtidos de plantas nativas do cerrado. Tese de doutorado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara-UNESP, Araraquara, SP, 2006.

SCHNELL, S.; OLIVARES, A.; PIÑA, B.; ECHAVARRI-ERASUN, B.; LACORTE, S.; PORTE, C. The combined use of the PLHC-1 cell line and the recombinant yeast assay to assess the environmental quality of estuarine and coastal sediments. *Marine Pollution Bulletin*, v.77, p.282–289, 2013.

SILVA, M. M.; QUEIROZ, L. P. A família Bignoniaceae na região de Catolés, Chapada Diamantina, Bahia, Brasil. *Sitientibus Série Ciências Biológicas*, v. 3, n. 1, p. 3-21, 2003.

SIMÃO, A. N. C. et al. Importância da Ingestão de Soja nos Sintomas do Climatério, Osteoporose e Doenças Cardiovasculares. *Arq. Ciênc. Saúde Unipar*, Umuarama, v. 12, n. 1, p. 67-75, 2008.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. Botânica Sistemática Guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil,

baseado em APG II. 2ª Ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda. 640 p. 2008.

TAGLIARI, K. C.; CECCHINI, R.; SARIDAKIS, H. O. Teste de Ames como uma ferramenta para detecção de citotoxicidade e mutagenicidade causada por metais pesados e radicais livres. *Semina Ci. Biol./Saúde*. v. 18/19, n. 2, p. 41-50, 1999.

TEIXEIRA, R. O.; CAMPAROTO, M. L.; MANTOVANI, M. S.; VICENTINI, V. E. P. Assessment of two medicinal plants, *Psidium guajava* L. and *Achillea millefolium* L., in in vitro and in vivo assays. *Genetics and Molecular Biology*, v.26, n.4, p.551-555, 2003.

TEJS, S. The Ames test: a methodological short review. *Environmental Biotechnology*. v.4, n. 2, p. 7-14, 2008.

TROCK, B. J.; HILAKIVI-CLARKE, L.; CLARKE, R. Meta-analysis of soy intake and breast cancer risk. *J. Natl. Cancer Inst.*, v.98, p.459-71, 2006.

TUROLLA, M. S. R.; NASCIMENTO, E. S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas* vol. 42, n. 2, abr./jun., 2006.

UNFER, V.; CASINI, M. L.; COSTABILE, L.; MIGNOSA, M.; GERLI, S.; DI RENZO, G. C. Endometrial effects of long-term treatment with phytoestrogens:

a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Fertil Steril*, v.82, p.145-8, 2004.

VERMEIRSEN, E. L. M.; BURKI, R.; JORIS, C.; PETER, A.; SEGNER, H.; SUTER, M. J. E. Characterization of the estrogenicity of swiss midland rivers using a recombinant yeast bioassay and plasma vitellogenin concentrations in feral male brown trout. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v.24, p.2226–2233, 2005.

VICENTINI, V. E. P.; CAMPAROTO, M. L.; TEIXEIRA, R. O., MANTOVANI, M. S. *Averrhoa carambola* L., *Syzygium cumini* (L.) Skeels and *Cissus sicyoides* L.: medicinal herbal tea effects on vegetal and animal test systems. *Acta Scientiarum*, v. 23, n. 2, p. 593-598, 2001.

VIEIRA, S.C.H.; SÓLON, S.; VIEIRA, M.C.; ZÁRATE, N.A.H. Levantamento de fitoterápicos manipulados em farmácias magistrais de Dourados-MS. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 20, n. 1, p. 28-34, 2010.

ZACHAREWSKI, T. Identification and assessment of endocrine disruptors: limitations of *in vivo* and *in vitro* assays. *Environ Health Perspect*, v. 106, n. 2, p. 577-582, 1998.

ZORZANO, E. G.; FERNÁNDEZ, J. C. Q.; GARCIA, E. F.; CONTRERAS, A. G. Efecto farmacológico de los diferentes compuestos activos del lúpulo sobre los

primeros síntomas físicos y emocionales en la etapa previa a La menopausia.

Rev Esp Nutr Comunitaria. v. 19, n. 1, p. 37-43, 2013.

Capítulo 2.

“Alice: Quanto tempo dura o eterno?
Coelho: Às vezes apenas um segundo.”

Lewis Carroll

Anexo 1. Lista de soluções e meios utilizados

Ensaio de mutagenicidade:

- Caldo nutriente:

Meio Oxoid.....0,75g

Água destilada q.s.p.....30mL

Autoclavar (121°C, 15 minutos).

- Top agar:

Agar.....1,2g

NaCl.....1,0g

água destilada q.s.p.....200mL

Autoclavar (121°C, 15 minutos).

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

Biotina.....0,00247g

Histidina.....0,00192g

Água destilada (45°C) q.s.p.....20mL

Autoclavar (121°C, 15 minutos).

-Agar mínimo glicosado (AGM):

Agar.....7,5g

Água destilada.....465mL

Glicose 40%: 25mL/465mL de meio (45mL água destilada + 20g glicose) ou

Glicose 8% (50mL de água + 4g de glicose); VB: 10 mL/465mL de meio.

Autoclavar (121°C, 15 minutos).

- VB (Vogel Bonner E):

Sulfato de magnésio.....0,75g

Ácido cítrico.....7,5g

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

Fosfato de sódio e amônio.....13,13g

Água destilada (45°C).....50,25mL

Dissolver os reagentes (1-4) sequencialmente na água, mantendo a temperatura em 45°C (banho quente). Autoclavar (121°C, 15 minutos).

- Tampão fosfato (0,2M):

Solução estoque A:

2,84g (Na_2HPO_4).....100mL(água destilada)

Solução estoque B: 2,76g (NaH_2PO_4).....100mL(água destilada).

Solução de uso: Misturar aproximadamente 30mL da solução A e aproximadamente 7mL da solução B. Ajustar o pH (7,4). Autoclavar (121°C, 15 minutos).

-Mistura S9:

Água miliQ estéril.....19,75mL

Tampão fosfato.....25mL

NADP (freezer).....2mL
 Glicose-6-fosfato (geladeira).....250µL
 MgCl (geladeira).....500µL
 KCl500µL
 Fração S9 (-80C).....Dissolvida em 2ml de água milQ estéril

- Solução de MgCl (0,4M):

MgCl₂.6H₂O.....0,1626g
 H₂O destilada.....2mL
 Autoclavar (121°C, 15 minutos).

- Solução de KCl (1,65M):

KCl.....0,246g
 H₂O.....2mL
 Autoclavar (121°C, 15 minutos).

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

G-6-P.....0,08463g
 H₂O destilada (estéril).....300µL

- Solução NADP (0.1M):

NADP.....0,15308g
 H₂O destilada (estéril).....2mL

- Azida sódica:

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

- 4-nitro-o-fenilenodiamina:

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

- Mitomicina C:

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

- 2-aminoantraceno:

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

- 2-aminofluoreno:

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

Ensaio RYA

- Meio YPD

Extrato levedura.....10g

Peptona.....20g

Água MiliQ.....900mL

Glicose 40%.....50mL

Ajustar o pH para 5,5 com HCl antes de completar o volume com água (1L no final). Autoclavar (121°C, 15 minutos).

- Meio Mínimo (MM)

Yeast Nitrogen Base.....1,7g

Sulfato de Amônio (NH₄)₂SO₄.....5g

Água Mili Q.....1,0L

Adicionar (soluções preparadas e autoclavadas separadamente):

Glicose 40%.....50mL

Metionina 10%.....1mL

Histidina 10%.....1mL

Ajustar o pH para 5,5 com HCl antes de completar o volume com água (1 L no final). Autoclavar (121°C, 15 minutos). Para meio sólido acrescentar ágar (20 g/L).

-Metionina 10%

Metionina.....0,1g

Água MiliQ.....1mL

-Histidina 10%:

Histidina.....0,1g

Água MiliQ.....1mL

-MuGal

Tampão Z.....100mL

**Triton X – 100 10%.....1mL

**SDS 10%.....1mL

Mercaptoetanol (Usar na capela).....70uL

MuGal.....21mg

-Triton X – 100 10% (líquido):

Triton X – 100.....0,1mL

Água MiliQ.....0,9mL

-SDS 10% (em pó):

SDS.....100mg

Água MiliQ.....1mL

-Tampão Z

Na_2PO_4 – 60mM.....8,52 g

NaH_2PO_4 – 40mM.....5,52 g

KCl – 10mM.....0,75 g

$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – 1mM.....1mL

Água MiliQ.....completar para 1L

Ajustar o pH para 7,0 (se precisar) com HCl antes de completar o volume de água. Não precisa autoclavar.

- $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – 1mM

$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – 1mM.....12,32g

Água MiliQ.....50mL