

Universidade Estadual Paulista UNESP

“Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

MÁRCIO BARCZYSZYN WEISS

AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE MUTAGÊNICA DE *Astronium*  
*fraxinifolium*, *Astronium urundeuva* e *Serjania marginata* Casar

Araraquara – 2014

MÁRCIO BARCZYSZYN WEISS

Avaliação de atividade mutagênica de *Astronium fraxinifolium*,  
*Astronium urundeuva* e *Serjania marginata* Casar.

Trabalho de Conclusão de Curso, apresentado ao Curso de Graduação em Farmácia-Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, para obtenção do grau de Farmacêutico-Bioquímico.

**Orientadora:** Profa. Dra. Eliana Aparecida Varanda.

**Co-orientadora:** Dra. Flávia Aparecida Resende

Departamento de Ciências Biológicas

Laboratório de Microbiologia

Araraquara – 2014

*No fim tudo dá certo, e se não deu certo  
é porque ainda não chegou ao fim.*

*- Fernando Sabino –*

*Dedico este trabalho ao meu Pai.*

## AGRADECIMENTOS

*Agradeço aos meus pais por serem os maiores exemplos que tenho na vida. A minha mãe, Maria Augusta, que foi fundamental para que tudo tenha se realizado, a cada passo dado foi graças a sua presença. Ao meu pai, Nelson, por tudo que me ensinou em vida, por todos os momentos vividos juntos, e principalmente por todas as alegrias e risadas que jamais serão esquecidas.*

*À minha orientadora Eliana Aparecida Varanda pela maior oportunidade da graduação, pela confiança por todos os ensinamentos e conselhos durante o trabalho. E por ser um exemplo a ser seguido.*

*À Flávia Resende por toda a dedicação e paciência e amizade. Foi muito bom trabalhar com ela e aprender com toda a experiência e alto astral no laboratório.*

*Aos meus amigos de república e faculdade, Erick Braga, Jhohann Benzi, Carolina Véspoli, Larissa Yida, Bruno Galante, Rodrigo Passos e Guilherme Nascimento por sempre estarem presentes, dando apoio ao trabalho e descontração nos momentos certos, tornando a faculdade inesquecível.*

*À amizade dos tempos de escola, Pablo Majer, Jessica Dipold, Juan Mutto, Raissa Souza, Mauricio Muller, Lucas Kiso e Gabriela Loureiro pela união, mesmo quando separados, e amor. Pelo ingresso e caminhada na vida universitária e por todos os caminhos que virão no futuro.*

*Aos amigos de All Pharma Junior e MEJ por terem sido uma fonte de conhecimento, desabafo e muito amor, Aline Perazzoli, Fernanda Coyado, Fernanda Yuri, Fernanda do Couto, Maria Aldrigui e Diego Kashiura.*

*Aos amigos do laboratório de microbiologia, sem os quais não teria tido graça todo esse percurso, e como fizeram ser tudo muito especial, Maryá Müller, Livia Espanha, Paula Boldrin, Mariana Santoro, Cate Nogueira, Ana Paula Oliveira, Rone De Grandis, Débora Leite e Bruna Lustri.*

*À FCFar e ao CNPq que proporcionaram apoio financeiro, infraestrutura e material para que a pesquisa virasse realidade.*

# Sumário

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>7</b>
1.1 – Plantas medicinais	
1.2 – Mutagenicidade e carcinogenicidade	
1.3 - Teste de Ames	
1.4 – Extratos vegetais estudados	
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>12</b>
<b>3. MATERIAL E METODOS</b>	<b>12</b>
3.1- Obtenção e identificação do material vegetal	
3.1.1- <i>Astronium fraxinifolium</i> Schott. (Anacardiaceae)	
3.1.2- <i>Astronium urundeuva</i> (Allemão) Engl. (Anacardiaceae)	
3.1.3- <i>Serjania marginata</i> Casar. (Sapindaceae)	
3.2- Preparação dos extratos EtOH 70%	
3.3- Preparo dos inóculos de <i>S. typhimurium</i>	
3.4- Preparo da mistura de S9	
3.5- Ensaios de mutagenicidade	
3.6- Obtenção dos resultados e Análise estatística	
<b>4. RESULTADOS</b>	<b>17</b>
4.1 – Mutagenicidade de <i>Astronium fraxinifolium</i>	
4.2 – Mutagenicidade de <i>Astronium urundeuva</i>	
4.3 – Mutagenicidade de <i>Serjania marginata</i> Casar	
<b>5. DISCUSSÃO</b>	<b>23</b>
5.1 – <i>Astronium</i> spp.	
5.2 – <i>Serjania marginata</i> Casar	
<b>6. CONCLUSÃO</b>	<b>28</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>29</b>
<b>8. DADOS FINAIS</b>	<b>40</b>

## Resumo

Diversos produtos químicos de origens vegetais são reportados por terem atividades sobre sistemas biológicos. Dentre as pesquisas visando o emprego dessas substâncias em novas aplicações farmacológicas, destaca-se a importância na obtenção de dados acerca da segurança e confiabilidade na utilização destas plantas. Para tal, o emprego do Teste de Ames (*Salmonella*/microsoma) para avaliar o potencial mutagênico tem sido amplamente usado. Por ser um ensaio bem aceito e confiável como triagem para detectar o potencial mutagênico, o trabalho teve como objetivo avaliar os extratos etanólicos de *Astronium fraxinifolium*, *Astronium urundeuva* e *Serjania marginata* Casar via utilização de linhagens bacterianas de *Salmonella typhimurium*, em presença e ausência de ativação metabólica com fração microsomal de enzimas S9. Contribuindo assim para uma avaliação toxicológica segura desses possíveis extratos. Como resultado foi observado a ausência de atividade mutagênica para todos os extratos vegetais avaliados em todas as linhagens de *S. typhimurium*. O que pode ser encarado com otimismo para dar continuidade da pesquisa destes extratos, visando um possível emprego na terapia humana e animal.

## **1 - Introdução**

### **1.1 – Plantas medicinais**

A utilização de plantas medicinais para a recuperação da saúde é uma prática globalizada, sendo o resultado do acúmulo secular de conhecimentos empíricos, de diversos grupos étnicos, sobre a ação dos vegetais, sendo predominantemente, os usuários de plantas medicinais e/ou medicamentos fitoterápicos, pessoas adultas e idosas, que utilizam essa terapêutica, muitas vezes, pela crença de que esta apresenta ausência de efeitos adversos (Alexandre, 2008).

O mercado mundial de plantas medicinais, apresentaram valor estimado de US\$ 22 bilhões, com taxas de crescimento anuais entre 10 e 20% (Marchese, et al., 2004). Estima-se que 82% da população brasileira utilizam produtos a base de ervas. O setor fitoterápico movimenta anualmente R\$ 1 bilhão em toda sua cadeia produtiva e emprega mais de 100 mil pessoas no Brasil. O Ministério da Saúde do Brasil vem orientando as Comissões Interinstitucionais de Saúde a buscarem o Sistema Único de Saúde no intuito de oficializar a fitoterapia como prática oficial da medicina, sendo que para isso, faz-se necessário que os profissionais conheçam as plantas medicinais de sua região (Abfisa, 2009). A Fitoterapia nos programas de atenção primária à saúde pode se constituir numa alternativa terapêutica muito útil devido sua eficácia aliada a um baixo custo operacional, a relativa facilidade para aquisição das espécies vegetais e ao contexto cultural no qual ela está inserida (Veiga Júnior, 2008).

## 1.2 - Mutagenicidade e carcinogenicidade

Além da terapêutica com base vegetal (fitoterapia), a dieta humana também corresponde a uma grande parcela no contato com agentes químicos potencialmente mutagênicos e carcinogênicos de origens naturais. Nos vegetais, por exemplo, metabólitos de ação genotóxica são sintetizados regularmente como defesa contra predadores (fungos e insetos). Já se sabe que alguns dos constituintes vegetais, como flavonóides e carotenóides podem desempenhar um importante papel na modulação do câncer (Albertini, et al., 2000; Ames, 1983).

O contato de produtos químicos de origens vegetais (fitoquímicos) e ambientais são reportados por apresentar atividades fisiológicas nos seres humanos e animais, podendo ser estes compostos biologicamente inócuos ao DNA. Porém, existem moléculas que, após sofrerem metabolização, originam formas quimicamente reativas ao material genético, com destaque especial para grupamentos químicos como compostos azo ou di-Azo, aminas aromáticas e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (Mortelmans, 2000).

Agentes mutagênicos são capazes de invadir as células e dirigirem-se ao núcleo, causando alterações no material genético, o acúmulo de danos no DNA podem levar a mudanças irreversíveis na sequência de nucleotídeos, desregulando assim o ciclo celular (Cardoso, et al., 2006). Uma vez que isso aconteça, pode fazer com que a célula se reproduza descontroladamente, podendo resultar em câncer (Brambilla, 2009).

Dessa forma, a importância na avaliação do risco/benefício perante estudos toxicológicos, principalmente ao que tange a toxicologia genética, das novas substâncias com potencial farmacológico, e/ou aquelas que atualmente fazem parte da dieta e do cotidiano de qualquer população (Doppalapudi et al., 2007), contribuindo para a padronização da produção de fitomedicamentos, o que é essencial para a segurança do usuário (Malviya, 2010).

Ensaio de toxidez genética são delineados para detectar direta ou indiretamente os danos causados por agentes químicos, tanto em sua forma natural, quanto metabolizados artificialmente, em um determinado genoma. Analisando a capacidade mutagênica de extratos de plantas, ou seus metabólitos vegetais isolados via teste de Ames (*Salmonella/microsoma*), ensaio capaz de detectar possíveis mutações induzidas quimicamente, de modo rápido, barato e confiável via sistema de mutação reversa bacteriana (Konuk et al., 2008).

### 1.3 - Teste de Ames

Para certificar sua segurança e garantir sua inocuidade em perspectiva genética os extratos estudados neste trabalho foram submetidos ao teste de Ames (*Salmonella/microsoma*), um ensaio de mutação reversa bacteriana, o qual é especificamente concebido para detectar uma vasta gama de substâncias químicas que possam induzir danos genéticos, e empregado e legitimado por institutos privados e governamentais (Boldrin et. al, 2013; Mortelmans, 2000).

Neste ensaio são empregadas linhagens de *Salmonella typhimurium* modificadas geneticamente para não produzir histidina (His-), via mutações no operon deste aminoácido (Maron, 1983). Mutações provocadas por agentes químicos no operon modificado pode reverter o quadro mutante, anulando a incapacidade de crescer e formar colônias na carência de histidina, restaurando a atividade normal do gene, e capacitando novamente a bactéria produzir histidina (His+). A **Tabela 1** apresenta o genótipo das linhagens utilizadas. (Mortelmans, 2000).

**Tabela 1.** Genótipo das linhagens de *S. typhimurium* (Mortelmans, 2000).

Cepa	Mutação	Operon <i>His</i>	Plasmídeo
TA97a	Frameshift	<i>his</i> G46	pKM101
TA98	Frameshift	<i>his</i> D3052	pKM102
TA100	Substituição	<i>his</i> G46	pKM103
TA102	Transversão	<i>his</i> G428	pKM104/pAQ1

Devido a incapacidade da *Salmonella* de metabolizar substâncias químicas via citocromo P450 (como em mamíferos e outros vertebrados), um componente-chave é adicionado ao ensaio, um sistema exógeno de ativação metabólica, fração microsossomal de enzimas S9 de fígado de rato, tornando assim possível a identificação de xenobióticos possivelmente mutagênicos de ação indireta, ou seja, cuja capacidade mutagênica é positiva para os metabólitos resultantes (Mortelmans, 2000).

Considerando o uso popular de plantas para finalidades medicinais, a investigação dos extratos das plantas *Astronium fraxinifolium*, *Astronium urundeuva* e *Serjania marginata* Casar, se faz necessária de modo a complementar a literatura disponível em relação a toxicologia genética, garantindo a segurança no uso e sua comercialização.

## **1.4 – Extratos vegetais estudados**

### **1.4.1 - O Gênero *Astronium***

Pertence à família *Anacardiaceae*, constituída de espécies arbóreas e arbustos, cujo território brasileiro abriga 15 gêneros e cerca de 70 espécies, de distribuição tropical e subtropical, sendo encontrada em todo o território brasileiro (Rachwal, et al., 2007).

#### **1.4.1.1 – *Astronium fraxinifolium***

Diferentes espécies são utilizadas na recuperação de áreas degradadas, tais como a espécie nativa de cerrado conhecida como Gonçalo-Alves, ou *A. fraxinifolium* devido ao fato de ser espécie pioneira em recuperação de biomas, seletiva xerófita, encontrada em terrenos rochosos e secos, onde forma grupamentos descontínuos, sendo agressiva e resistente às condições adversas (Aguilar, et al., 2001). Registros de óleos essenciais constituem a maior parte de sua literatura conhecida, ao relacionar as análises realizadas por CCD (cromatografia de

camada delgada) (Anvisa, 2010), indicam grande presença de taninos, terpenos, alcaloides, flavonóides e saponinas presentes nas folhas e cascas desta espécie (Da Silva, et al., 2010; Rodrigues-Burbano, 2010). Apresenta atividade bactericida moderada contra as bactérias Gram-negativas devido à peroxidação do LPS, desempenho observado devido à presença do óleo essencial  $\gamma$ -3-caroteno, provável responsável pela peroxidação (Montanari, 2010).

#### **1.4.1.2 - *Astronium urundeuva***

Popularmente conhecida como Aroeira-Preta, de acordo com a literatura possui atividades antiulcerogênica (Carlini et al., 2010) e antiinflamatória (Souza et al., 2007). Aroeira-vermelha, aroeira-mansa, aroeira-branca, aroeira-da-praia, aroeira-do-sertão, aroeira-do-paraná, são outros exemplos de *Astronium* conhecidos (Baggio, 1988).

#### **1.4.2 - O Gênero *Serjania* – *Serjania marginata***

Segundo Coulleri (2012) a família Sapindaceae, a qual se faz pertencente a *S. marginata*, compreende cerca de 230 espécies, relacionadas e identificadas de modo genético. Com distribuição preferentemente nos trópicos, ocorrendo raramente em regiões subtropicais e temperadas (Klassen, 1999).

Os estudos do gênero *Serjania* são extremamente escassos, tanto no aspecto químico como farmacológico. Conhecidas popularmente como timbó ou tinguí, é uma das famílias que apresenta maior número de espécies de trepadeiras (Gentry, 1991). Algumas *Serjanias* são utilizadas não somente como planta medicinal, mas também como ornamentos, exemplo da *Serjania marginata* Casar (Guarim Neto, et al., 2000), que tem por disseminação popular o uso das folhas para dor de estômago (Bourdy et al., 2004).

## **2-Objetivos**

O objetivo do trabalho foi avaliar a atividade mutagênica dos extratos vegetais das plantas *Astronium fraxinifolium*, *Astronium urundeuva* e *Serjania marginata* Casar, através do teste de Ames (*Salmonella*/microsoma) em presença e ausência de ativação metabólica (+S9 e – S9 respectivamente) empregando quatro linhagens de *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA102 e TA97a.

## **3- Material e Métodos**

### **3.1- Obtenção e identificação do material vegetal**

Todos os extratos avaliados nesse estudo, assim como as informações sobre a sua composição química foram fornecidos pelo Instituto de Química da UNESP, campus Araraquara-SP, sob a coordenação do Prof. Dr. Wagner Vilegas e Profa. Dra. Lourdes Campaner dos Santos.

#### **3.1.1- *Astronium fraxinifolium* Schott. (Anacardiaceae)**

Coletado no município de Porto Nacional - TO por Cristiano Borges Pereira, em dezembro/2007. A identificação foi feita pelo Dr. Eduardo Ribeiro dos Santos e catalogada com o número de exsicata 333, sendo que exemplar se encontra depositado no Herbário da Universidade do Tocantins (HUTO).

### **3.1.2- *Astronium urundeuva* (Allemao) Engl. (Anacardiaceae)**

*A. urundeuva* (Allemao) Engl. (voucher n° 1444) foi coletado no município paulista de Bálamo. Os exemplares foram coletados em novembro/2007 e identificados pelo Prof. Dr. Jorge Tamashiro (IB – UNICAMP). Exsicatas foram depositadas no herbário da Universidade Estadual de Campinas (UEC). O nome da espécie *A. urundeuva* (Allemao) Engl. possui sinonímia sob nome de *Myracrodruon urundeuva* Allemao.

### **3.1.3- *Serjania marginata* Casar. (Sapindaceae)**

O Exemplar de *S. marginata* Casar. foi coletada em fevereiro de 2011, em um fragmento de Cerrado localizado no loteamento S 21° 59' 41,8" e W 55° 19' 24,9", no Assentamento Lagoa Grande, distrito de Itahum, no município de Dourados-MS, a 429 m de altitude. A exsicata foi depositada no Herbário BOTU (n° 027797).

## **3.2- Preparação dos extratos EtOH 70%**

Após separar as partes das plantas selecionadas para o estudo, estas foram secas em estufa a 40°C, moídas em moinhos de facas, sendo posteriormente pesadas, embaladas, etiquetadas e armazenadas em local seco.

O material vegetal foi submetido à percolação com EtOH 70%, ou seja, o material moído foi previamente intumescido com etanol 70% (v/v) durante 2 horas fora do percolador. Após esse período, o percolador foi empacotado com a mistura (pó + etanol 70%), sendo o empacotamento feito da forma mais homogênea possível, evitando a formação de bolhas ou buracos no conteúdo alocado dentro do percolador. A altura do enchimento obedeceu a proporção 5:1 (cada 5 referente ao percolador 1 do pó da espécie) em relação ao tamanho do percolador. A vazão do percolador foi ajustada entre 1,0 e 2,0 mL/min/Kg de material vegetal

comum tamanho médio de partícula de 1 a 3 mm. Todos os extratos foram rota-evaporados sob pressão reduzida em temperatura de 40°C, liofilizados para completa remoção da água e armazenados em frascos âmbar vedados. Após esse processo foi determinado o rendimento do extrato.

### **3.3- Preparo dos inóculos de *S. typhimurium***

Com alça de inoculação, pequena quantidade da cultura estoque congelada foi semeada em 30 mL de caldo nutriente (Oxoid nº 2), incubada em shaker a 37°C, por 14 horas a 2,86 G, obtendo ao final a densidade de  $1-2 \times 10^9$  bactérias/ mL de caldo.

### **3.4- Preparo da mistura de S9**

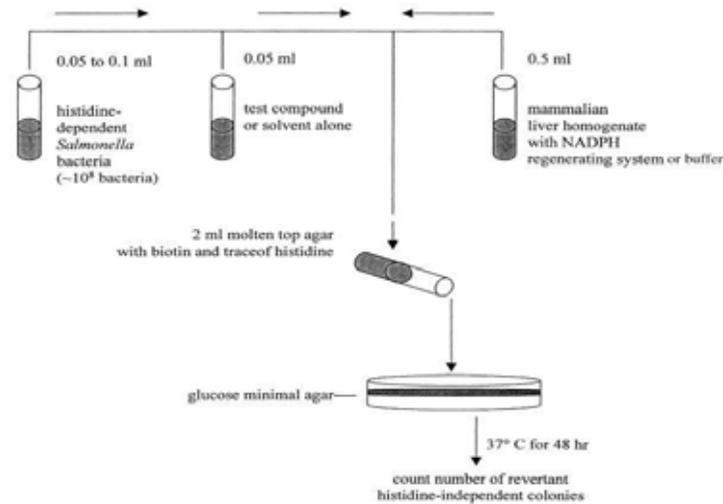
Foi utilizada a fração microsomal S9 homogeneizada de fígado de rato Sprague Dawley (fração pós-mitocondrial, com cofator, preparada a partir de fígado de roedores, aroclor 1254- 500 mg/ kg, adquiridos sob a forma liofilizada da Moltax Molecular Inc., Annapolis, USA). A fração S9 revela se a substância ou amostra é mutagênica em sua forma original ou necessita ser metabolizada ou ativada para se tornar mutagênica (indireta). Essa mistura foi mantida em banho de gelo durante todo o ensaio. O preparo se dá com a mistura de 19,75 mL de água miliQ estéril com 25 mL de tampão fosfato pH 7,4. Seguindo da adição a esta solução, 2 mL NADP (0,15308g/2ml água) armazenado em freezer, 250 µL de glicose-6-fosfato (0,08463g/300µL água), 500 µL de MgCl e 500 µL de KCl. Por último foi adicionado a Fração S9 (armazenada em freezer -80°C) dissolvida em 2 mL de água miliQ estéril. A solução após pronta deve ser mantida a fresco e utilizadas num período máximo de 3 horas.

### 3.5- Ensaios de mutagenicidade

Os ensaios de mutagenicidade de cinco diferentes concentrações dos extratos etanólicos 70% das folhas e cascas de *A. fraxinifolium* e folhas e caule de *A. urundeuva* e das folhas de *S. marginata*, foram conduzidos de acordo com a metodologia de pré-incubação, desenvolvida por Maron e Ames (1983). Para tanto, foram utilizadas as linhagens TA98, TA100, TA102 e TA97a de *S. typhimurium*, fornecidas pelo Dr. Bruce Ames da Universidade de Berkeley, Califórnia, EUA.

Os extratos foram dissolvidos em DMSO. As concentrações foram selecionadas com base em testes preliminares de toxicidade. A determinação da toxicidade no teste de Ames foi baseada na avaliação quantitativa do número final de revertentes na placa, após incubação de 48 horas. A evidência visual da ocorrência de toxicidade se dá pela presença de poucos revertentes His<sup>+</sup> ou pela sua total ausência, acompanhado algumas vezes pela formação de crescimento fino de fundo preenchendo a placa (background).

Para cada ensaio foram empregados controles positivos e negativos. O controle negativo foi o mesmo em presença e em ausência de ativação metabólica (S9), dimetil sulfóxido (DMSO) 100 µL / placa, utilizado também na solubilização dos extratos teste. O controle positivo é singular para testes em presença de enzimas S9 (+S9), sendo 2-aminoantraceno 1,25 µg/ placa em todas as linhagens empregadas. Nos ensaios sem ativação metabólica (-S9) os controles são específicos, o 4-nitro-*o*-fenilenodiamina (NPD - 10 µg / placa) para TA98, azida sódica (AZS- 1,25 µg / placa) para TA100 e mitomicina C (MMC - 0,5 µg / placa) para TA102. A Figura 2 representa o fluxograma do ensaio.



**Figura 2:** Fluxograma do ensaio de Ames (Mortelmans, 2000).

Na realização do ensaio foram incorporadas as cinco concentrações dos compostos, 0,5 mL de tampão fosfato ou mistura S9, 0,1 mL de caldo nutriente para a cultura de bactérias (Oxóide nº2), e então incubados a 37 °C por 20 - 30 minutos, de modo a obter densidade de  $1-2 \times 10^9$  bactérias/mL. Em seguida, foram adicionados à mistura 0,1 mL Ágar de superfície (top Agar) suplementado com traços de histidina e biotina. Homogeneizou-se levemente e plaqueou-se em meio mínimo glicosado, via metodologia “pour plate”. Após solidificação do top agar, as placas foram incubadas a 37°C por 48 horas. Após esse período, as colônias revertentes foram contadas manualmente. O ensaio foi realizado em triplicata.

### 3.6 - Obtenção dos resultados e Análise estatística

Os resultados foram analisados utilizando o programa estatístico Salanal (U.S. Environmental Protection Agency, Monitoring Systems Laboratory, Las Vegas, NV, versão 1.0, do Research Triangle Institute, RTP, Carolina do Norte, EUA), adotando o modelo de Bernstein *et al.* (1982). Os dados (revertentes/ placa) foram avaliados pela análise de variância (ANOVA),

seguido de uma regressão linear. O índice de mutagenicidade (IM) também foi calculado para cada concentração testada, de acordo com a fórmula:

$$\text{IM} = \frac{\text{número de revertentes/placa com o composto-teste (revertentes induzidas)}}{\text{número de revertentes/ placa com o controle (solvente) negativo}}$$

A amostra foi considerada mutagênica quando houve uma relação dose resposta entre as concentrações testadas e o número de revertentes induzidos e/ ou quando o IM foi maior ou igual a dois em pelo menos uma das doses testadas.

#### **4- Resultados**

Os resultados do Teste de Ames se encontram nas tabelas a seguir, indicando os valores referentes para cada uma das cinco concentrações utilizadas dos extratos, sendo expressos estes valores como, a média dos revertentes/ placa (M), desvio padrão (DP) e índice de mutagenicidade (IM), para as quatro linhagens de *Salmonella typhimurium* utilizadas (TA98, TA100, TA102 e TA97a), em presença e ausência de ativação metabólica (+S9) e (-S9) respectivamente, seguindo ordem crescente das concentrações e para os controles positivo (C+) e negativo. As concentrações para cada extrato foram determinadas via ensaios de citotoxicidade, sendo o limite mínimo o valor expresso por uma resposta estatística em relação ao controle negativo, e a concentração máxima a inferior a tóxica celular. A partir das informações foram estabelecidas as cinco concentrações utilizadas nas quatro linhagens empregadas no ensaio de Ames. Os testes de citotoxicidade devem ser realizados em presença e ausência de S9.

#### 4.1 – Mutagenicidade de *Astronium fraxinifolium*

Os resultados de mutagenicidade para o extrato etanólico das folhas de *A. fraxinifolium* estão na **Tabela 2**, cujas concentrações empregadas foram: 0,13; 0,25; 0,50; 0,75; 1,00 mg/placa para as folhas de (AFF), e 0,0125; 0,025; 0,050; 0,075; 0,100 mg/placa para a casca (AFC). Não foi observada atividade mutagênica para os extratos em nenhuma das linhagens e concentrações testadas, tanto na ausência (-S9) quanto na presença de metabolização enzimática (+S9).

#### 4.2 – Mutagenicidade de *Astronium urundeuva*

Os resultados da mutagenicidade de *A. urundeuva* estão apresentados na parte inferior da **Tabela 2**. As concentrações analisadas foram de 0,13; 0,25; 0,50; 0,75; 1,00 mg/placa para o caule (AUC) em todas as linhagens de *S. typhimurium*. E para as folhas de *A. urundeuva* as concentrações foram de 0,0125; 0,025; 0,050; 0,075; 0,100 mg/placa. Não foi observada atividade mutagênica para ambos os extratos em nenhuma das linhagens e concentrações testadas, tanto na presença (+S9) quanto na ausência da fração de enzimas S9.

#### 4.3 – Mutagenicidade de *Serjania marginata* Casar

Na **Tabela 3** estão expressos a atividade mutagênica das folhas de *S. marginata* (SMF) pelos números de revertentes e seus respectivos desvios padrões (DP) e índices de mutagenicidade (IM), na ausência (-S9) e presença (+S9) de ativação metabólica, para as quatro linhagens de *S. typhimurium*. O extrato padronizado não foi mutagênico para nenhuma linhagem de *S. typhimurium* nas concentrações de 0,13; 0,25; 0,50; 0,75; 1,00 mg/ placa.

**Tabela 2** - Atividade mutagênica expressa pela média e desvio-padrão do número de revertentes por placa, e o índice de mutagenicidade (IM - valor entre parênteses) nas linhagens TA98, TA100, TA102 e TA97a de *S. typhimurium* tratadas com diferentes concentrações de extratos etanólicos 70% das folhas e cascas de *Astronium fraxinifolium* e folhas e caule de *Astronium urundeuva*, com (+S9) e sem (-S9) ativação metabólica.

Tratamentos		Número de revertentes (M ± DP)/ placa e IM							
		TA 98		TA 100		TA 102		TA 97a	
mg/plate	- S9	+ S9	- S9	+ S9	- S9	+ S9	- S9	+ S9	
<b>0,00<sup>a</sup></b>	15 ± 3	26 ± 6	137 ± 6	110 ± 10	345 ± 11	259 ± 52	164 ± 20	147 ± 21	
<b>0,13</b>	18 ± 4 (1,2)	21 ± 6 (0,8)	154 ± 4 (1,1)	123 ± 11 (1,1)	319 ± 12 (0,9)	309 ± 64 (1,2)	241 ± 39 (1,5)	256 ± 31 (1,7)	
<b>0,25</b>	21 ± 6 (1,4)	25 ± 4 (0,9)	172 ± 7 (1,3)	127 ± 6 (1,1)	303 ± 39 (0,9)	305 ± 43 (1,2)	255 ± 36 (1,5)	257 ± 29 (1,7)	
<b>0,50</b>	15 ± 3 (1,0)	24 ± 2 (0,9)	129 ± 7 (0,9)	132 ± 7 (1,2)	299 ± 23 (0,9)	287 ± 21 (1,1)	226 ± 27 (1,4)	256 ± 38 (1,7)	
<b>0,75</b>	20 ± 5 (1,4)	24 ± 6 (0,9)	131 ± 17 (1,0)	118 ± 13 (1,1)	282 ± 22 (0,8)	269 ± 44 (1,0)	236 ± 34 (1,4)	238 ± 32 (1,6)	
<b>1,00</b>	14 ± 3 (1,0)	28 ± 2 (1,1)	134 ± 6 (1,0)	114 ± 8 (1,0)	204 ± 25 (0,6)	251 ± 66 (1,0)	176 ± 26 (1,1)	230 ± 61 (1,6)	
<b>C +</b>	847 ± 17 <sup>b</sup>	1322 ± 63 <sup>e</sup>	1669 ± 27 <sup>c</sup>	1488 ± 77 <sup>e</sup>	1626 ± 66 <sup>d</sup>	1275 ± 72 <sup>e</sup>	965 ± 57 <sup>b</sup>	1352 ± 89 <sup>e</sup>	

	<b>0,00<sup>a</sup></b>	15 ± 3	26 ± 6	137 ± 6	110 ± 10	345 ± 11	259 ± 52	86 ± 7	147 ± 21
	<b>0,0125</b>	19 ± 6 (1,3)	25 ± 4 (0,9)	169 ± 7 (1,2)	95 ± 18 (0,9)	323 ± 20 (0,9)	317 ± 29 (1,2)	72 ± 2 (0,8)	201 ± 28 (1,4)
	<b>0,025</b>	18 ± 1 (1,2)	26 ± 2 (1,0)	163 ± 3 (1,2)	106 ± 7 (1,0)	313 ± 16 (0,9)	311 ± 33 (1,2)	110 ± 5 (1,3)	212 ± 43 (1,4)
<b>AFC</b>	<b>0,050</b>	18 ± 4 (1,2)	25 ± 5 (0,9)	152 ± 10 (1,1)	101 ± 13 (0,9)	307 ± 28 (0,9)	298 ± 75 (1,1)	95 ± 5 (1,1)	223 ± 24 (1,5)
	<b>0,075</b>	21 ± 2 (1,4)	20 ± 5 (0,8)	142 ± 8 (1,0)	108 ± 12 (1,0)	292 ± 21 (0,8)	267 ± 79 (1,0)	93 ± 6 (1,1)	221 ± 27 (1,5)
	<b>0,100</b>	20 ± 1 (1,3)	21 ± 3 (0,8)	153 ± 6 (1,1)	110 ± 13 (1,0)	323 ± 12 (0,9)	289 ± 57 (1,1)	86 ± 4 (1,0)	192 ± 22 (1,3)
	<b>C +</b>	847 ± 17 <sup>b</sup>	1322 ± 63 <sup>c</sup>	1669 ± 27 <sup>c</sup>	1488 ± 77 <sup>e</sup>	1626 ± 66 <sup>d</sup>	1275 ± 72 <sup>e</sup>	1077 ± 47 <sup>b</sup>	1352 ± 89 <sup>e</sup>
	<b>0,00<sup>a</sup></b>	15 ± 3	26 ± 6	137 ± 6	110 ± 10	345 ± 11	259 ± 52	164 ± 20	147 ± 21
	<b>0,0125</b>	17 ± 4 (1,2)	25 ± 4 (0,9)	159 ± 15 (1,2)	122 ± 7 (1,1)	316 ± 14 (0,9)	303 ± 37 (1,2)	232 ± 17 (1,4)	254 ± 27 (1,7)
	<b>0,025</b>	14 ± 1 (0,9)	25 ± 3 (0,9)	132 ± 5 (1,0)	126 ± 21 (1,1)	345 ± 16 (1,0)	309 ± 29 (1,2)	217 ± 45 (1,3)	229 ± 20 (1,6)
<b>AUF</b>	<b>0,050</b>	18 ± 7 (1,2)	24 ± 4 (0,9)	145 ± 6 (1,1)	101 ± 7 (0,9)	326 ± 15 (0,9)	315 ± 49 (1,2)	189 ± 30 (1,1)	197 ± 30 (1,3)
	<b>0,075</b>	17 ± 4 (1,2)	24 ± 3 (0,9)	134 ± 9 (1,0)	108 ± 20 (1,0)	352 ± 21 (1,0)	307 ± 27 (1,2)	148 ± 24 (0,9)	212 ± 23 (1,4)
	<b>0,100</b>	18 ± 2 (1,2)	21 ± 6 (0,8)	124 ± 8 (0,9)	98 ± 8 (0,9)	339 ± 15 (1,0)	327 ± 45 (1,3)	152 ± 20 (0,9)	188 ± 20 (1,3)
	<b>C +</b>	847 ± 17 <sup>b</sup>	1322 ± 63 <sup>c</sup>	1669 ± 27 <sup>c</sup>	1488 ± 77 <sup>e</sup>	1626 ± 66 <sup>d</sup>	1275 ± 72 <sup>e</sup>	965 ± 57 <sup>b</sup>	1352 ± 89 <sup>e</sup>

	<b>0,00<sup>a</sup></b>	15 ± 3	26 ± 6	137 ± 6	110 ± 10	345 ± 11	259 ± 52	164 ± 20	147 ± 21
	<b>0,13</b>	14 ± 3 (1,0)	27 ± 1 (1,0)	143 ± 13 (1,0)	135 ± 10 (1,2)	316 ± 19 (0,9)	344 ± 32 (1,3)	256 ± 13 (1,6)	245 ± 34 (1,7)
	<b>0,25</b>	16 ± 7 (1,1)	32 ± 3 (1,2)	140 ± 6 (1,0)	120 ± 19 (1,1)	317 ± 18 (0,9)	339 ± 62 (1,3)	279 ± 30 (1,7)	252 ± 31 (1,7)
<b>AUC</b>	<b>0,50</b>	19 ± 2 (1,3)	24 ± 5 (0,9)	140 ± 20 (1,0)	122 ± 14 (1,1)	311 ± 13 (0,9)	273 ± 44 (1,1)	229 ± 34 (1,4)	218 ± 21 (1,5)
	<b>0,75</b>	15 ± 5 (1,0)	21 ± 4 (0,8)	134 ± 10 (1,0)	121 ± 7 (1,1)	322 ± 23 (0,9)	288 ± 42 (1,1)	215 ± 22 (1,3)	206 ± 18 (1,4)
	<b>1,00</b>	23 ± 5 (1,6)	25 ± 4 (0,9)	142 ± 12 (1,0)	118 ± 10 (1,1)	286 ± 14 (0,8)	251 ± 46 (1,0)	209 ± 16 (1,3)	208 ± 42 (1,4)
	<b>C +</b>	847 ± 17 <sup>b</sup>	1322 ± 63 <sup>c</sup>	1669 ± 27 <sup>c</sup>	1488 ± 77 <sup>c</sup>	1626 ± 66 <sup>d</sup>	1275 ± 72 <sup>e</sup>	965 ± 57 <sup>b</sup>	1352 ± 89 <sup>e</sup>

(ANOVA) M ± DP = média e desvio padrão; IM = índice de mutagenicidade; AFF = Extrato etanólico 70% das folhas de *A. fraxinifolium*; AFC = Extrato etanólico 70% das cascas de *A. fraxinifolium*; AUF = Extrato etanólico 70% das folhas de *A. urundeuva*; AUC = Extrato etanólico 70% do caule de *A. urundeuva*; <sup>a</sup>Controle negativo: DMSO, dimetilsulfóxido: 100 µL/placa; Controle positivo (C +): <sup>b</sup>4-nitro-*o*-fenilenodiamino (NPD – 10,0 µg/ placa – TA98); <sup>c</sup>Azida Sódica (AZS - 1,25 µg/placa – TA100); <sup>d</sup>Mitomicina C (MMC - 0,5 µg/ placa – TA102), em ausência de S9 e <sup>e</sup>2-aminoantraceno (2-AA - 1,25 µg/ placa – TA98, TA100, TA102 e TA97a), na presença de S9.

**Tabela 3** - Atividade mutagênica expressa pela média e desvio-padrão do número de revertentes por placa e o índice de mutagenicidade (IM - valor entre parênteses) nas linhagens TA98, TA100, TA102 e TA97a de *S. typhimurium* tratadas com diferentes concentrações de extratos etanólicos 70% das folhas de *S. marginata* Casar, com (+S9) e sem (-S9) ativação metabólica.

Tratamentos		Número de revertentes (M ± DP)/ placa e IM							
		TA 98		TA 100		TA 102		TA 97a	
mg/placa		-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9
	<b>0,00<sup>a</sup></b>	24 ± 8	45 ± 4	158 ± 8	162 ± 12	467 ± 53	563 ± 15	158 ± 19	164 ± 23
	<b>0,13</b>	24 ± 5 (1,0)	29 ± 6 (0,6)	170 ± 18 (1,1)	137 ± 10 (1,2)	524 ± 31 (1,1)	528 ± 8 (1,0)	170 ± 51 (1,1)	158 ± 25 (1,0)
	<b>0,25</b>	25 ± 5 (1,1)	26 ± 9 (0,6)	184 ± 14 (1,2)	149 ± 19 (1,1)	533 ± 66 (1,1)	555 ± 44 (1,2)	110 ± 36 (0,7)	151 ± 16 (0,9)
<b>SMF</b>	<b>0,50</b>	37 ± 14 (1,5)	30 ± 4 (0,7)	185 ± 21 (1,2)	122 ± 14 (1,1)	557 ± 40 (1,2)	484 ± 33 (0,9)	126 ± 20 (0,8)	140 ± 16 (0,9)
	<b>0,75</b>	42 ± 2 (1,8)	21 ± 4 (0,8)	218 ± 25 (1,4)	121 ± 7 (1,1)	515 ± 16 (1,1)	428 ± 36 (0,8)	174 ± 31 (1,1)	144 ± 36 (0,9)
	<b>1,00</b>	41 ± 3 (1,7)	25 ± 4 (0,9)	225 ± 32 (1,4)	118 ± 10 (1,1)	549 ± 48 (1,2)	506 ± 7 (0,9)	143 ± 17 (0,9)	115 ± 21 (0,7)
	<b>C +</b>	1097 ± 115 <sup>b</sup>	1322 ± 63 <sup>c</sup>	1152 ± 128 <sup>c</sup>	1488 ± 77 <sup>e</sup>	2329 ± 173 <sup>d</sup>	1955 ± 72 <sup>e</sup>	1048 ± 93 <sup>b</sup>	1272 ± 76 <sup>e</sup>

(ANOVA) M ± DP = média e desvio padrão; IM = índice de mutagenicidade; SMF = Extrato etanólicos 70% das folhas de *Serjania marginata* Casar <sup>a</sup>Controle negativo: DMSO, dimetilsulfóxido: 100 µL/placa; Controle positivo (C +): <sup>b</sup>4-nitro-*o*-fenilenodiamino (NPD - 10,0 µg/ placa - TA98); <sup>c</sup>Azida Sódica (AZS - 1,25 µg/placa - TA100); <sup>d</sup>Mitomicina C (MMC - 0,5 µg/ placa - TA102), em ausência de S9 e <sup>e</sup>2-aminoantraceno (2-AA - 1,25 µg/ placa - TA98, TA100, TA102 e TA97a), na presença de S9.

## 5- Discussão

Produtos naturais são uma fonte alternativa para obtenção de novas drogas contra doenças. A fitoterapia tornou-se foco na busca popular para recuperar a saúde, particularmente em países em desenvolvimento como o Brasil, cuja biodiversidade vegetal é uma das maiores do mundo, e pelo fato de que a população, mais carente na perspectiva financeira, encontra na fitoterapia preços mais acessíveis em relação aos medicamentos industrializados, tornando comum auto-medicação, como a utilização de plantas de modo insensato e possivelmente perigoso a saúde (Obici et al., 2008).

Verifica-se que é imperativa a realização de ensaios para a avaliação da mutagenicidade (Marques et al., 2003), bem como de outros riscos decorrentes do consumo de produtos naturais pela população. No Brasil, a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) determina através da Resolução nº 90 de 2004, que todo medicamento fitoterápico deve ser avaliado quanto à sua toxicidade aguda ou por doses repetidas, bem como quanto à genotoxicidade. Para a avaliação da genotoxicidade, caso os fitoterápicos sejam utilizados em tratamentos de longa duração, a ANVISA determina que sejam empregados os testes de Ames e do Micronúcleo. O teste de Ames, usado no presente estudo, tem sido amplamente utilizado como uma ferramenta de triagem para estabelecer uma estimativa inicial de mutagenicidade e de carcinogenicidade (Resende et al., 2012). É um teste mundialmente reconhecido quanto à sua eficiência na detecção de mutações pontuais por diferentes agentes.

No entanto, há uma falta de estudos científicos acerca da toxicidade e efeitos adversos de plantas medicinais e extratos vegetais. Investigações são absolutamente necessárias, especialmente para a *A. fraxinifolium*, *A. urundeuva* e *S. marginata* que são comumente usados na medicina popular, e não apresentam na literatura muitas informações sobre suas respectivas atividades mutagênicas e carcinogênicas (Olson et al., 2000). Para minimizar os riscos da

exposição de agentes agressores ao ser humano, os ensaios de toxidez visam identificar substâncias químicas naturais, inclusive de plantas, cujo efeito possa ser tóxico para os organismos (Varanda, et al., 2002).

Como as plantas medicinais provaram ser fontes abundantes de compostos biologicamente activos, os resultados dos testes de genética toxicológica em combinação com um perfil farmacológico adequado são usados como base para aprovar ensaios clínicos de candidatos a drogas (Resende et al., 2012).

Neste estudo, o teste de Ames foi realizado utilizando as linhagens TA98, TA100, TA97 e TA102 de *Salmonella typhimurium*, bactérias sensíveis como indicadores de danos no DNA, na ausência (-S9) e presença (+ S9) do sistema de ativação metabólica.

Os resultados podem apresentar diferenças na mutagenicidade entre as linhagens empregadas, podendo ser positivo em uma ou mais delas, ou ainda em nenhuma, devido ao fato de que compostos químicos podem induzir mutações a partir de mecanismos diferentes, o que justifica a utilização das quatro linhagens (Ansah et al., 2005).

Nenhum resultado demonstrou mutagenicidade para as cepas empregadas TA98, TA100, TA102 e TA97a em nenhuma das concentrações.

## **5.2 – *Astronium spp.***

Os resultados obtidos mostraram que os extratos das folhas e cascas de *A. fraxinifolium* e folhas e caule de *A. urundeuva* não induziram aumento significativo no número de colônias nas condições utilizadas nesse estudo, em ausência de metabolização (-S9) e com presença de ativação metabólica (+S9) para todas as quatro linhagens (TA98, TA100, TA102 e TA97a).

O gênero *Astronium*, estabelecido por Jacquin em 1760 e pertencente à família Anacardiaceae, é neotropical e reúne espécies arbóreas, com frutos de cálice persistente e

acrescente no fruto, que resulta em aspecto estrelado, sendo esta característica que dá nome ao gênero (Carmello-Guerreiro, 2000). Espécies desse gênero destacam-se pela madeira de alta qualidade, resistência química e mecânica, além de serem plantas produtoras de vernizes (Pell, 2004).

O gênero *Astronium* é composto por cerca de 35 espécies, sendo típico das regiões norte e nordeste do Brasil, porém muito encontrado também na região sudeste. De acordo com a literatura, a espécie *Astronium urundeuva* foi a mais estudada, sendo detectadas atividades antiulcerogênica (Carlini et al., 2010; Souza et al., 2007; Rao et al., 1987), anti-inflamatória (Souza et al., 2007; Viana et al., 2003) antibacteriana, antifúngica (Sá et al., 2009a), neuroprotetora (Nobre Junior et al., 2007) e efeitos no trânsito gastrointestinal (Menezes et al., 1988) e em colites (Rao et al., 1986).

Lectina isolada do caule de *A. urundeuva* apresentou atividade inseticida (Sá et al., 2008; Napoleão et al., 2011) e larvicida em *Aedes aegypti* (Sá et al., 2009b). O extrato aquoso de apresentou citotoxicidade em células cancerígenas e inibiu o crescimento de cáries em ratos (Menezes et al. 2010). Gel contendo fração do extrato de *A. urundeuva* rica em chalconas apresentou efeito no tratamento de periodontite em ratos (Botelho et al., 2008). A casca e entrecasca de *A. urundeuva* são indicadas na medicina popular contra diarreias. A casca também é usada no tratamento de hemorroidas. O chá das raízes é empregado contra reumatismo, o chá das folhas no tratamento de úlceras da pele e o chá dos frutos contra dor de dente (Almeida et al., 1998; Desmarchelier et al., 1999; Menezes et al., 2010).

Sob o ponto de vista químico, foram detectados e isolados polifenóis (proantocianidinas), chalconas e ligninas da madeira (Napoleão et al., 2011; Morais et al., 1999) e as chalconas urundeuvinas I, II e III, responsáveis pelas atividades analgésica e anti-inflamatória (Botelho et al., 2008).

A ampla utilização de espécies do gênero *Astronium* na medicina popular, a investigação de diversas atividades farmacológicas com resultados positivos, a sua distribuição por todo o país e incipiência de dados químicos aprofundados justificam os estudos deste gênero botânico.

No presente estudo, foram avaliados os extratos EtOH 70% das folhas e caule de *A. urundeuva* e folhas e cascas de *A. fraxinifolium*. Os resultados obtidos mostraram que nenhum dos diferentes extratos de *Astronium* apresentou potencial mutagênico nas condições utilizadas nesse estudo. Considerando o uso popular dessas espécies, o efeito mutagênico negativo em sistemas bacterianos é altamente relevante.

### **5.3 – *Serjania marginata* Casar**

*S. marginata* tem potencial medicinal e suas folhas são popularmente indicadas para dor de estômago (Bourdy et al., 2004). No entanto, não foram encontrados dados na literatura que comprovam essa atividade, nem o perfil fitoquímico e estudos sobre o efeito toxicológico ou mutagênico dessa espécie. Dessa maneira, baseado na informação etnofarmacológica, a avaliação da atividade mutagênica do extrato EtOH 70% das folhas de *S. marginata* foi extremamente relevante, uma vez produtos naturais são promissoras fontes de novos agentes potencialmente terapêuticos, mas o equilíbrio entre os efeitos terapêuticos e toxicológicos é uma medida muito importante para utilização de um composto farmacológico (Resende et al., 2012).

De acordo com o estudo fitoquímico, o extrato EtOH 70% foi submetido à triagem por cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC) (Wagner, 2003), à prospecção fitoquímica, HPLC-DAD e espectrometria de massas, a fim de se determinar a classe de produtos naturais presentes e, conseqüentemente, estabelecer uma estratégia para a separação dos componentes. Foi possível constatar a presença de esteroides, saponinas, flavonóides e taninos, que corrobora com resultados citados na literatura de que a família *Sapindaceae* é uma rica fonte

de saponinas glicosiladas, flavonoides, taninos, isoprenóides, polifenóis, triterpenos, diterpenos, lecitinas e hidrogéis (Gomes, 2007; Arruda, 2008; Guenka, 2008).

O extrato etanólico das folhas de *S. marginata* não apresentou resultado mutagênico, em nenhuma das concentrações testadas nas quatro linhagens de *S. typhimurium* empregadas, em ambos os experimentos, com ou sem ativação metabólica.

Estudos para identificar compostos presentes em vegetais e quantificá-los nas frações obtidas a partir de extrações feitas com diferentes solventes, testes para determinação das atividades biológicas e toxicológicas tanto *in natura*, quanto em compostos isolados e/ou industrializados são importantes para garantir segurança na utilização dos vegetais por pessoas e animais. A negatividade para mutagênese é favorável para o futuro em aplicações destes extratos em medicamentos fitoterápicos, devido ao fato de já apresentarem uma certa segurança genética em sua utilização, podendo ser estudado para aplicação de suas frações em uma ampla gama de produtos industriais, assim como um favorecimento do consumo *in natura* como droga vegetal. (Courcelle, 2003).

No entanto, esta pesquisa deve ser complementada por avaliações em modelos *in vivo*, onde pode-se determinar a farmacodinâmica e a farmacocinética. A proposta de que se faça necessária a implementação de outros ensaios para estabelecer os efeitos tóxicos e farmacológicos associados com atividade biológica (Hamedt, et al., 2014).

## 6- Conclusão

Concluindo os resultados apresentados, há a indicativa de que não houve atividade mutagênica dos extratos de *A. fraxinifolium*, *A. urundeuva* e *S. marginata*. O teste de mutagenicidade de Ames (*Salmonella*/microssoma) por se tratar de uma das técnicas mais aceitas pelos órgãos regulamentadores para avaliar a atividade mutagênica, implica em grande confiabilidade em partes dos resultados. O resultado pode ser visto como animador e promissor, tendo em vista a possibilidade de aplicar tais extratos na terapêutica humana e animal, disponibilizando estes para o consumo e comercialização (ANVISA, 2009).

Porém este ensaio *in vitro* não elimina todos os riscos para o material genético, portanto não é passível de se afirmar ainda que exista total segurança na utilização destas plantas na terapêutica. Testes *in vitro* de citotoxicidade, mutagenicidade e teratogenicidade se fazem necessários, como análise citogenética para analisar danos estruturais cromossômicos, teste do Micronúcleo (perdas de fragmentos ou de todo o cromossomo), teste do Cometa para verificar de danos em DNA, por exemplo. E ensaios *in vivo* de toxicidade aguda, subcrônica e crônica para observar os efeitos produzidos por uma substância em animais de laboratório. A exposição de animais de experimentação a agentes tóxicos em altas doses é um método necessário para validação e investigação de possíveis riscos no homem, podendo estimar a toxicidade intrínseca (DL50), identificar órgãos alvo e manifestações clínicas, identificar diferenças entre espécies e quais são as mais susceptíveis, verificar reversibilidade da resposta tóxica e determinação de dose. Sinergicamente com ensaios sobre a efetividade de mecanismo de ação farmacológico complementam os dados para plena utilização humana, tanto *in natura*, quanto em aplicações laboratoriais e industriais destas plantas (Klaassen, 2008).

## 7- Referências Bibliográficas

ABIFISA- Associação Brasileira das Empresas do Setor Fitoterápico, Suplemento Alimentar e de Promoção da Saúde. Disponível em <<http://www.abifisa.org.br/introducao.asp>>. Acesso em 08/11/2009.

AGUIAR, A. V.; BORTOLOZO, R. R.; TEIXEIRA DE MORAES, M. L.; EUSTÁQUIO DE SÁ, M. Determination of parameters in genetic population of Gonçalo-alves (*Astronium fraxinifolium*) through physiological characteristics of seed. *Scientia Florestales*, v. 60, p. 89-97, 2001.

ALBERTINI, R. J.; ANDERSON, D.; DOUGLAS, G. R.; HAGMAR, L.; HEMMINKI, K.; MERLO, F.; IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. *Mutation Research*, v. 463, p. 111-172, 2000.

ALEXANDRE, R. F.; BAGANTINI, F.; SIMÕES, C. M. O. Interactions between pharmaceuticals and herbal medicines or Ginko Ginseng herbal. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. v. 18(2), p. 117-126, 2008.

ALMEIDA, S.P.; PROENÇA, C.E.; SANO, S.M.; RIBEIRO, J.F.; 1998. Cerrado: espécies vegetais úteis. EMBRAPA. Planaltina Distrito Federal, 38–39.

AMES, B. N. Dietary carcinogens and anti-carcinogens. *Science*. v. 221, p. 1256-

1264, 1983.

ANSAH, C., KHAN, A., GOODERHAM, N. J. In vitro genotoxicity of the West African anti-malarial herbal *Cryptolepis sanguinolenta* and its major alkaloid cryptolepine. *Toxicology*, v. 208, p. 141–147, 2005.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Protocol OECD 471 (1997). SBMCTA Guildelines. Brasília, 2009.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Farmacopeia Brasileira, volume 1. 5ª Ed. Brasília, 2010.

ARRUDA, A. P. C. C. B. N. Avaliação da atividade antiulcerogênica e tóxica dos extratos metanólicos e clorofórmico das folhas de *Serjania erecta* Radlk (Sapindaceae). 2008. 71f. Dissertação (Biologia Geral e Aplicada) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Botucatu.

BAGGIO, A. J. Aroeira as a potential for multiple uses on the country estate. *Bulletin of Florest Research*, Colombo, v. 17, p. 25-32, 1988.

BERNSTEIN, L.; KALDOR, J.; McCANN, J.; PIKE, M. C. An empirical approach to the statistical analysis of mutagenesis data from the *Salmonella* test. *Mutation Research*, v.

97(4), p. 267-281, 1982.

BRAMBILLA, G.; MARTELLI, A. Genotoxicity and carcinogenicity studies of antihypertensive agents. *Mutation. Research.* v.612, p. 115–149, 2009.

BOLDRIN, P. K.; RESENDE, F. A.; HÖHNE, A. P. O.; CAMARGO, M. S.; ESPANHA, L. G.; NOGUEIRA, C. H.; MELO, M. S. F.; VILEGAS, W.; VARANDA, E. A. Estrogenic and mutagenic activities of *Crotalaria pallida* by recombinant yeast assay and Ames test. *BMC Complementary and Alternative Medicine.* v. 13, p. 216-226, 2013.

BOTELHO, M. A.; RAO, V. S.; MONTENEGRO, D.; BANDEIRA, M. A.; FONSECA, S. G. C.; NOGUEIRA, N. A. P.; RIBEIRO, R. A.; BRITO, G. A. C. Effects of a herbal gel containing carvacrol and chalcones on alveolar bone resorption in rats on experimental periodontitis. *Phytotherapy Research*, v. 22, p. 442-449, 2008.

BOURDY, G.; CHÁVEZ, DE MICHEL, L. R.; ROCA-COULTHARD, A. Pharmacopeia in a shamanistic society: the Izoceño-Guaraní (Bolivian Chaco). *Journal of Ethnopharmacology*, v. 91, p. 189-208, 2004.

CARDOSO, C. R. P.; CÓLUS, I. M. S.; BERNARDI, C. C.; SANNOMIYA, M.; VILEGAS, W.; VARANDA, E. A. Mutagenic activity promoted by amentoflavone methanolic extract of *Byrsonima crassa* Niedenzu. *Toxicology*, v. 225, p. 55-63, 2006.

CARLINI, E. A.; DUARTE-ALMEIDA, J. M.; RODRIGUES, E.; TABACH, R. Antiulcer effect of the pepper trees *Schinus terebinthifolius* Raddi (aroeira-da-praia) and *Myracrodruon urundeuva* Allemão, Anacardiaceae (aroeira=do-sertão). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 20, n. 2, p. 140-146, 2010.

CARMELLO-GUERREIRO, S. M.; PAOLI, A. A. S. Estrutura do pericarpo e da semente de *Astronium graveolens* Jacq. (Anacardiaceae) com notas taxonômicas. *Rev Brasil. Bot.*, v. 23 (1), p.87-96, 2000.

COULLERI, j. P.; DEMATTEIS, M.; FERRUCCI, M. S. A new insight into *Serjania* Mill. (Sapindaceae, Paullinieae) infrageneric classification: a cytogenetic approach. *Plant Systematics and Evolution*. v. 298 (9), p. 1743-1753, 2012.

COURCELLE, J.; HANAWALT, P. C. A dependent recovery of arrested DNA replication forks. *Annual Review of Genetics*, v. 37, p. 611–646, 2003.

DA SILVA, N. L. A.; MIRANDA, F. A. A.; DA CONCEIÇÃO, G. M. Phytochemical screening of plants of Cerrado, the Municipal environmental protection area of Inhamum, Caxias, Maranhão. *Scientia Plena*, v. 6 (2), p. 1-17, 2010.

DESMARCHELIER, C.; ROMÃO, R. L.; COUSSIO, J.; CICCIA, G. Antioxidant and free radical scavenging activities in extracts from medicinal trees used in the “Caatinga” region in northeastern Brazil. *J Ethnopharmacol.*, v. 67, p. 69-77, 1999.

DOPPALAPUDI, R.S.; RICCIO, E. S.; RAUSCH, L. L.; SHIMON J. A.; LEE, P. S.; MORTELMANS, K. E.; KAPETANOVIC, I. M.; CROWELL, J. A.; MIRISALIS, J. C. Evaluation of chemopreventive agents for genotoxic activity. *Mutation Research*, v. 629, p. 148-160, 2007.

GUARIM NETO, G.; SANTANA, S. R.; SILVA, J. V.B.; Ethnobotanical notes of *Sapindaceae Jussieu. Acta Botânica Brasílica*, .14(3), p. 327-334, 2000.

GUENKA, L. C. Avaliação da atividade antinociceptiva e antiedematogênica de extratos etanólicos de *Zeyheria montana* e *Serjania erecta* em ratos e camundongos. 2008. 90f. Dissertação (Biotecnologia) – Universidade de Ribeirão Preto.

GENTRY, A. H. The distribution and evolution of climbing plants. In: Putz F. E. & Mooney, H. A. (eds). *The Biology of vines. Cambridge University Press*, 1991.

GOMES, R. C. Prospecção biológica por drogas antinociceptivas e antiinflamatórias provenientes do extrato de plantas medicinais “em ensaios pré-clínicos”. 2007. 61f. Dissertação (Biotecnologia) – Universidade de Ribeirão Preto.

HAMEDT, A. L.; ORTIZ, I. C.; GARCÍA-HUERTAS, P. A.; SÁENZ, J.; CALDEIRA DE ARAUJO, A.; DE MATTOS, J. C. P.; RODÍGUEZ-GAZQUEZ, M.A.;

TRIANA-CHÁVEZ, O. Cytotoxic, mutagenic and genotoxic evaluation of crude extracts and fractions from *Piper jericense* with trypanocidal action. *Acta Tropica*, v. 131, p. 92-97, 2014.

KLAASSEN, C.D. (Ed.). Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons. 7th. Ed., 2008.

KLASSEN, R.; Wood anatomy of the Sapindaceae, IAWA, *Journal Supplement 2*, p. 214, 1999.

KONUK, M.; AKYIL, D.; LIMAN, R.; ÖZAKARA, A. Examination of the mutagenic effects of some pesticides. *Fresen Environ Bull*, v. 17, p. 439-442, 2008.

MARCHESE, J. A.; BROETTO, F.; MING, L. C.; GOTO, R.; STEFANINI, M. B.; GALINA, A.; TEDESCO, A. C.; CONTE, C.; MINIUK, C.M.; SCHURT, D. A.; SANGALETTI, E.; SILVA, G. O.; GOMES, G.; BERTAGNOLLI, J. A.; FRANCHESCHI, L.; COSSA, M. L.; MORAES, M. R. D.; LIMA, P. M.; LIRA, R.; COSTA, S. Perfil dos consumidores de plantas medicinais e condimentares do município de Pato Branco (PR). *Horticultura Brasileira*, Brasília, v.22(2), p.332-335, 2004.

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

MARQUES, R.C.P.; MEDEIROS, S.R.B.; DIAS, C.S.; BARBOSA-FILHO, J.; AGNEZ-LIMA, L.F. Evaluation of the mutagenic potential of yangambin and of the hydroalcoholic extract of *Ocotea duckei* by the Ames Test. *Mutat Res.*, v. 536, p. 117-120, 2003.

MALVIYA, N.; JAIN, S.; MALVIYA, S. Antidiabetic Pontential of Medicinal Plants. *Acta Poloniae Pharmaceutica – Drug Research*, v. 67(2), p. 113-118, 2010.

MENEZES, A.M.; RAO, V.S. Effect of *Astronium urundeuva* (aroeira) on gastrointestinal transit in mice. *Braz J Med Biol Res*, v. 21 (3), p. 531-533, 1988.

MENEZES, T. E. C.; DELBEM, A. C. B.; BRIGHENTI, F. L.; OKAMOTO, A. C.; JARDIM JUNIOR, E. G. Protective efficacy of *Psidium cattleianum* and *Myracrodruon urundeuva* aqueous extracts against caries development in rats. *Pharmac Biol*, v. 48 (3), p. 300-305, 2010.

MORAIS, S. A. L.; NASCIMENTO, E. A.; QUEIROZ, C. R. A. A.; PILO-VELOSO, D.; DRUMOND, M. G. Studies on polyphenols and lignin os *Astronium urundeuva* wood. *J Braz Chem Soc*, v. 10 (6), p. 447-452, 1999.

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

MONTANARI, R. M. Composição química e atividade biológica dos óleos essenciais de espécies de *Anacardiaceae*, *Siparunaceae* e *Verbenaceae*. Tese de Doutorado – Universidade Federal de Viçosa, p. 173, Dezembro de 2010.

NAPOLEÃO, T. H.; GOMES, F. S.; LIMA, T. A.; SANTOS, N. D. L.; SÁ, R. A.; ALBUQUERQUE, A. C.; COELHO, L. C. B. B.; PAIVA, P. M. G. Termiticidal activity of lectins from *Myracrodruon urundeuva* against *Nasutitermes corniger* and its mechanisms. *Int Biodeter Biodeg*, v. 65, p. 52-59, 2011.

NOBRE JUNIOR, H. V.; MAMIA, F. D.; OLIVEIRA, R. A.; BANDEIRA, M. A. M.; PESSOA, C. O.; MORAES, M. O.; CUNHA, G. M. A.; VIANA, G. S. B. Neuroprotective actions of tannins from *Myracrodruon urundeuva* on 6-Hydroxydopamine-Induced neuronal cell death. *J Herbs Spices Med Plants*, v. 13 (2), p. 41-57, 2007.

OBICI, S.; OTOBONE, F. J.; SELA, V. R. S.; ISHIDA, K.; SILVA, J. C.; NAKAMURA, C.V.; CORTEZ, D. A. G.; AUDI, E. A. Preliminary toxicity study of dichloromethane extract of *Kielmeyera coriacea* stems in mice and rats. *Journal of Ethnopharmacology*. v. 115, p. 131–139, 2008.

OLSON, H.; BETTON, G.; ROBINSON, D.; THOMAS, K.; MONORO, A.; KOLAJA, G.; LILLY, P.; SANDERS J.; SIPES, G.; BRACKEN, W.; DORATO, M.; VAN DEUN, K.; SMITH, P.; BERGER, B.; HELLER, A. Concordance of the toxicity of pharmaceuticals in humans and in animals. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. v. 32, p. 56–67, 2000.

PELL, S. K. Molecular systematic of the cashew family (*Anacardiaceae*). 2004. 207 f. Dissertation (Doctor of Philosophy) - Department of Biological Science, Faculty of the Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College, Louisiana, 2004.

RACHWAL, M. F. G.; CARVALHO, P. E. R.; WITHERS, L. H. O.; GAIAD, S. Environmental education in eco-reflexion following the forest of Embrapa. Ed. 1, Publisher Colombo, PR, Brasil, 2007.

RAO, V. S.; MENEZES, A. M. S.; VASCONCELOS, F. A.; ALMEIDA, F. R. C.; FONTELES, M. C. Effect of *Astronium urundeuva* Engl. (aroeira) in experimental colites. *Braz J Medical Biology Res*, v. 19, p. 568-568, 1986.

RAO, V. S.; VIANA, G. S.; MENEZES, A. M. S.; GADELHA, M. G. Studies on the anti-ulcerogenic activity of *Astronium urundeuva*. *Brazilian Journal of Medical and Biology Research*, v. 20, p. 803-805, 1987.

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(5), p. 5255-5268, 2012.

RODRIGUES-BURBANO, D.; QUIJANP-CELIS, C. E.; PINO, J. A. Composition of the essential oil from leaves of *Astronium graveolens* Jacq grown in Colombia. *Journal of Essential Oil Research*, v. 22,n. 6, p. 488-489, 2010.

SÁ, R. A.; GOMES, F. S.; NAPOLEÃO, T. H.; SANTOS, N. D. L.; MELO, C. M. L.; GUSMÃO, N. B.; COELHO, L. D. L.; PAIVA, P. M. G.; BIEBER, L. W. Antibacterial and antifungal activities of *Myracrodruon urundeuva* heartwood. *Wood Sci Technol*, v. 43, p. 85-95, 2009a.

SÁ, R. A.; NAPOLEÃO, T. H.; SANTOS, N. D. L.; GOMES, F. S.; ALBUQUERQUE, A. C.; XAVIER, H. S.; COELHO, L. D. L.; BIEBER, L. W.; PAIVA, P. M. G. Induction of mortality on *Nasutitermes corniger* (Isoptera, Termitidae) by *Myracrodruon urundeuva* heartwood lectin. *Int Biodeter Biodegr.*, v. 62, 460-464, 2008.

SÁ, R. A.; SANTOS, N. D. L.; SILVA, C. S. B.; NAPOLEÃO, T. H.; GOMES, F. S. CAVADA, B. S.; COELHO, L. C. B. B.; NAVARO, D. M. A. F.; BIEBER, L. W.; PAIVA, P. M. G. Larvicidal activity of lectins from *Myracrodruon urundeuva* on *Aedes aegypti*, *Compar Biochem Physiol, Part C*, v. 149, p. 300-306, 2009b.

SOUZA, S. M. C.; Aquino, L. C. M.; MILACH JUNIOR, A. C.; BANDEIRA, M. A. M.; NOBRE, M. E. P.; VIANA, G. S. B. Antiinflammatory and antiulcer properties of tannins from *Myracrodruon urundeuva* Allemão (*Anacardiaceae*) in rodents. *Phytoth Res.*, v. 21, p. 220-225, 2007.

VARANDA, E. A.; POZETTI, G. L.; LOURENÇO, M. V.; VILEGAS, W.; RADDI, M. S. Genotoxicity of *Brosimum gaudichaudii* measured by the Salmonella/microsome assay and chromosomal aberrations in CHO cells. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 81 (2), p. 257-264, 2002.

VEIGA JÚNIOR, V. F. Estudo do consumo de plantas medicinais na Região Centro-Norte do Estado do Rio de Janeiro: aceitação pelos profissionais de saúde e modo de uso pela população. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, v. 118 (2), p. 308-313, 2008.

VIANA, G. S. B.; BANDEIRA, M. A. M.; MATOS, F. J. A. Analgesic and antiinflammatory effects of chalcones isolated from *Myracrodruon urundeuva* Allemão. *Phytomedicine*, v. 10, p. 189-195, 2003.

WAGNER, H.; BLADT, S.; ZGAINSKI, E. M. Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas. Springer: Berlin, 2003.

## **8 - Dados Finais**

De acordo,

---

Orientador

---

Aluno

Araraquara, 12 de janeiro de 2015