



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

MARCELA STEFANINI FERREIRA TSUBOY

**AVALIAÇÃO DA MUTAGENICIDADE DOS EXTRATOS DE  
FOLHA E RAIZ DA PLANTA MEDICINAL COCCOLOBA  
MOLLIS (POLYGONACEAE) EM DIFERENTES SISTEMAS –  
TESTE**

---

Londrina  
2008

**MARCELA STEFANINI FERREIRA TSUBOY**

**AVALIAÇÃO DA MUTAGENICIDADE DOS EXTRATOS DE  
FOLHA E RAIZ DA PLANTA MEDICINAL COCCOLOBA  
MOLLIS (POLYGONACEAE) EM DIFERENTES SISTEMAS –  
TESTE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Mário Sérgio Mantovani

Londrina  
2008

**MARCELA STEFANINI FERREIRA TSUBOY**

**AVALIAÇÃO DA MUTAGENICIDADE DOS EXTRATOS DE  
FOLHA E RAIZ DA PLANTA MEDICINAL COCCOLOBA  
MOLLIS (POLYGONACEAE) EM DIFERENTES SISTEMAS –  
TESTE**

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Mário Sérgio Mantovani  
Universidade Estadual de Londrina, UEL

---

Profa. Dra. Lúcia Regina Ribeiro  
Universidade Estadual Paulista, UNESP

---

Profa. Dra. Sílvia Helena Sofia  
Universidade Estadual de Londrina, UEL

Londrina, 22 de julho de 2008.

*Dedico esta dissertação aos maiores responsáveis por sua realização: meus pais Ruy e Silvana, meus avós maternos Inês e Nino e meus avós paternos (in memoriam) Haruzo e Esmeralda.*

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer imensamente ao **Prof. Dr. Mário Sérgio Mantovani**, pela oportunidade oferecida. Por ter me recebido tão bem em seu laboratório, sem ao menos conhecer-me, quando ainda terminava minha graduação e quando começaria então nosso convívio e amizade. Obrigada pelos conselhos, pelos momentos de estresse e de descontração, pelas palavras serenas e otimistas nos meus dias de desespero e incertezas, mas, sobretudo, obrigada por acreditar em mim e fazer com que minha insegurança, muitas vezes exarcebada, se transformasse em segurança e confiança. Espero ter correspondido às suas expectativas e ter colaborado para o progresso do laboratório.

Agradeço imensamente também à **Profa. Dra. Lúcia Regina Ribeiro**, a verdadeira “culpada” pela minha vinda à Londrina. Obrigada por ter sido sempre tão prestativa e por ter acreditado em mim desde o primeiro momento, quando ainda nos conhecíamos apenas por email ou telefone. Obrigada pelo incentivo e pela oportunidade de ter realizado uns dos meus maiores desejos acadêmicos, estudar fora do país. Espero ter correspondido à altura naquela ocasião, e que ainda possamos passar mais alguns anos juntas, trabalhando para a realização de mais um desejo, o doutorado.

Aos membros titulares e suplentes da comissão examinadora, **Profa. Dra. Sílvia Helena Sofia**, **Profa. Dra. Ilce Mara de Syllos Cólus** e **Prof. Dr. Edson Luís Maistro**, pela colaboração e sugestões para a melhoria da redação final.

Ao **Programa de Mestrado em Genética e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Londrina**, pela oportunidade concedida.

A todos os **docentes** do programa, pela atenção, paciência e ensinamentos.

Aos funcionários **Dário** e **Melissa**, pela atenção e auxílio cotidiano no laboratório e, especialmente à **Sueli**, pela atenção, paciência, conselhos e auxílio burocrático mesmo antes do meu ingresso no programa.

Aos amigos de mestrado das **turmas 2006/01, 2007** e, principalmente da turma **2006/02: Ilara, Selma e Éverson**. Obrigada pela amizade, preocupação e pelos momentos de

descontração e estudo conjunto. Amigos, tenho um palpite: a “turma esquecida do meio do ano” sempre será lembrada!

Obrigada a **todos os amigos e colegas do Laboratório de Genética Toxicológica**, especialmente à Ju, Josi, Zé, meus “estagiários queridos” Andressa, Diogo, Natália, Simone e Vander, à Sandra, aos “Rodrigos” e à “Li” e “Rô”.

**Ju e Josi:** Praticamente meus anjos-da-guarda em Londrina! Obrigada pela amizade, pela presença constante, por todos os dias e noites (cansativas, mas felizes) de experimentos no lab. Obrigada pela dedicação, pelo ombro amigo, pelo ouvido atento, pelas risadas e lágrimas compartilhadas, pelos conselhos, pelas palavras de incentivo, pela torcida, e também pelo carinho e cuidado nos dias de indisposição física.

**Zé:** Obrigada pela amizade e pelas palavras incentivadoras que você vem nos trazer toda vez que volta à Londrina. Obrigada pela lembrança quando surgem estudos em colaboração, demonstrando que você tem confiança e acredita no nosso trabalho. Obrigada também pelas dicas com as culturas de células, e pela ajuda com o Alemão quando o Inglês não foi suficiente, na nossa temporada de estágio em Viena!

**“Estagiários queridos”:** Obrigada pelos momentos de alegria no lab, pelos poucos almoços no RU e por nossos divertidos encontros extra-lab. Espero ter contribuído pelo menos um pouquinho com o trabalho de vocês. Além disso, espero ter despertado um maior interesse de vocês pela Mutagênese, para que todos continuem por aqui ano que vem!

**“Rodrigos”:** Obrigada pelos conselhos, incentivo e auxílio no início e término da dissertação.

À **Profa. Dra. Dalva Trevisan Ferreira** e ao **Iuri**, do Laboratório de Pesquisas em Moléculas Bioativas, pela atenção, paciência e auxílio com os extratos.

À **Profa. Dra. Rosa Elisa C. Linhares** e ao **Prof. Dr. Carlos Nosawa**, do Laboratório de Virologia, pelo auxílio na implantação da técnica de análise de indução da apoptose.

À **Profa. Dra. Danielle P. de Oliveira** e às mais novas amigas **Elisa** e **Farah**, do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas (USP, Ribeirão Preto), pela atenção, amizade e pela colaboração na avaliação dos extratos pelo Teste de Ames.

Ao **pessoal de Assis, meus amigos biólogos**, inesquecíveis e sempre presentes, por todos os

momentos de felicidade, tristezas, incertezas e conquistas que vivemos e viveremos em Assis e região ou onde quer que estejamos. Pela confiança, amizade, carinho, conselhos e admiração que temos um pelo outro. Muito obrigada Leandro, Davi, Ligiana, Giselli, Camila, Ágatha, Fernanda e Lilian.

Aos **amigos de Londrina**, Ivan; Dalita, Juliana Mara, Ronaldo e pessoal de outras turmas e outros programas; pessoal do Espanhol e do NAFI; Ana, Camila, Aline e Vanessa e; em especial ao pessoal da “colônia nipônica londrinense”: Alexandre, Márcia, Adriana, Rodrigo e Fernando, pela calorosa acolhida, pelos momentos hilários e descontraídos, pelo carinho e preocupação e pelos inúmeros passeios pela cidade!

Ao **pessoal de Marília**, amigos de longa data. Crescemos juntos e compartilhamos muitas alegrias e tristezas. Passamos pela adolescência, vestibular, faculdade, deixamos a casa de nossos pais, arranjamos o primeiro emprego, alguns se casaram, outros foram para o outro lado do mundo. Mas o laço que nos une ainda permanece intacto, mesmo que às vezes nos esquecemos de mandar notícias. Obrigada a todos os amigos de mais uma grande “colônia japonesa”, principalmente à Ju, Elis, Luciene, Mel, Dani, Melina, Zi.

À **minha família, principalmente meus pais e avós**. Obrigada novamente pelo apoio incondicional, pela preocupação em investir em minha educação desde a infância, pela confiança, pela segurança, pelo incentivo e por toda a dedicação e amor. Foram muitos os sacrifícios para se chegar até aqui, e certamente eu não conseguiria se não fosse por vocês, meus pais! Obrigada também aos avós, tios e tias que sempre demonstraram preocupação e admiração e que se prontificaram em ajudar materialmente e psicologicamente.

A todos aqueles que participaram de forma direta ou indireta para o êxito deste trabalho. Aos que ajudaram, muito obrigada. Aos que atrapalharam, obrigada também, pois vocês me mostraram o quanto posso ser forte e o quanto Deus me abençoou ao colocar tantas outras pessoas boas em minha vida!

TSUBOY, Marcela Stefanini Ferreira. **Avaliação da mutagenicidade dos extratos de folha e raiz da planta medicinal *Coccoloba mollis* (Polygonaceae) em diferentes sistemas-teste.** 2008. 94f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2008.

## RESUMO

O uso das plantas medicinais pela população é uma prática antiga e ainda bastante difundida, o que faz com que estudos sobre uma possível atividade mutagênica sejam essenciais. A *Coccoloba mollis* Casaretto (Polygonaceae) é uma espécie vegetal popularmente pouco conhecida, mas que tem sido utilizada como fitoterápico em Londrina, PR., sendo registrada no “*Guia Homeopático da Farmácia Q. curatun*” com o nome de “*Erva da memória*”. Este fitoterápico tem sido relatado como benéfico principalmente em casos de falta de memória e estresse. No presente estudo, os extratos etanólicos de folha e raiz da *Coccoloba mollis* foram avaliados quanto a um possível efeito mutagênico, citotóxico e indutor de apoptose em sistemas-teste *in vitro* e *in vivo*. Para a avaliação *in vitro* foi utilizada a linhagem hepática de *Rattus norvegicus* (HTC) nos ensaios de citotoxicidade (MTT) e mutagenicidade (Cometa e Micronúcleo com bloqueio de citocinese - MNCTB) e; as linhagens TA98 e TA100 de *Salmonella typhimurium* no ensaio *Salmonella*/microsoma. *In vivo*, a mutagenicidade foi avaliada em sangue periférico de camundongos, também através dos ensaios do Cometa e Micronúcleo. Com os resultados obtidos em todos os experimentos pode-se dizer que o extrato preparado a partir das raízes da *C. mollis* possui maior toxicidade. Esta toxicidade mostrou-se extremamente alta às linhagens de *Salmonella* investigadas, TA100 e TA98, especialmente quando acrescido a esta última metabolização exógena (S9). No ensaio MTT, em células HTC, o extrato da raiz mostrou-se citotóxico em concentração dez vezes inferior (a partir de 200 µg/mL) a concentração do extrato obtido das folhas da *C. mollis* (a partir de 2000 µg/mL). A medida que as concentrações de ambos os extratos aumentam mais células entram em apoptose, sendo a maior concentração testada (200 µg/mL) estatisticamente significativa. Os resultados dos experimentos de mutagenicidade *in vitro* mostram que nenhuma das concentrações empregadas, de ambos os extratos, foi mutagênica às células HTC no ensaio MNCTB, embora tenha sido detectada genotoxicidade na maior concentração avaliada no ensaio Cometa, sugerindo a indução de danos reparáveis. Praticamente, o mesmo ocorreu no ensaio *Salmonella*/microsoma, no qual nenhuma das concentrações analisadas do extrato da raiz foi capaz de aumentar significativamente o número de revertentes/placa. Entretanto, o extrato da folha foi capaz de induzir danos no DNA da linhagem TA98, na ausência de S9 na maior concentração testada, embora em potência mutagênica muito baixa. Os experimentos realizados *in vivo* demonstraram que houve um aumento no número de cometas e micronúcleos observados, porém estes resultados não foram significativos estatisticamente. Os dados obtidos sugerem que apesar da baixa capacidade de indução de danos ao DNA nas condições experimentais realizadas, os extratos da *C. mollis*, especialmente o obtido das raízes, possuem alta toxicidade e capacidade de indução de apoptose. Assim, o conhecimento dos fitoquímicos presentes nestes extratos aliado à investigação mais detalhada sobre efeitos biológicos da *Coccoloba mollis* seria importante para a comprovação científica dos efeitos propostos popularmente e para proporcionar uma maior segurança aos usuários desta planta medicinal.

**Palavras-chave:** Plantas medicinais. *Coccoloba mollis*. Mutagenicidade. Citotoxicidade. *In vitro*. *In vivo*.

TSUBOY, Marcela Stefanini Ferreira. **Mutagenic evaluation of the leaf and root extracts from the medicinal plant *Coccoloba mollis* (Polygonaceae) in different test-systems.** 2008. 94p. Dissertation (Master degree in Genetics and Molecular Biology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2008.

## ABSTRACT

The use of medicinal plants by population is an ancient and widespread practice, which makes researches about its potential mutagenic activity essential. *Coccoloba mollis* Casaretto (Polygonaceae) is a vegetal specie not very popularly known, but it has been used as phytotherapeutic in Londrina, PR, being registred in the “*Guia Homeopático da Farmácia Q. curatun*” under the name “*Erva da memória*”. This phytotherapeutic has been reported as beneficial mainly in cases of lacking of memory and stress. In the present study, the ethanolic extracts from the leaf and root from *Coccoloba mollis* were investigated in relation to their potential mutagenic, cytotoxic and apoptosis inductor effects in *in vitro* and *in vivo* test-systems. The *in vitro* evaluation was made using the hepatic lineage of *Rattus norvegicus* (HTC) in the cytotoxicity (MTT) and mutagenicity (Comet and Micronucleus with cytokinesis block –MNCtB) assays and; the strains TA98 and TA100 of *Salmonella typhimurium* in the *Salmonella*/microsome assay. *In vivo*, mutagenicity was evaluated in peripheral blood erythrocytes of mice, also using Comet and Micronucleus assays. The results obtained with all experiments showed that the extract prepared with the roots of *C. mollis* possesses greater toxicity. The toxicity was extremely high to the investigated *Salmonella* strains, TA100 and TA98, especially when added to the latter exogenous metabolization (S9). In MTT assay, with HTC cells, the root extract showed cytotoxicity in concentration ten times lower (since 200 µg/mL) than the concentration of the extract obtained from the leaves of *C. mollis* (since 2000 µg/mL). With the increase of the concentration of both extracts more cells undergo apoptosis, being the highest concentration tested (200 µg/mL) which is statistically significant. The results of the *in vitro* mutagenicity experiments demonstrate that none of the evaluated concentration, of both extracts, were mutagenic to HTC cells in MNCtB assay, instead of the genotoxicity detected in the highest concentration of the Comet assay, suggesting induction of repairable damage. Almost the same occurred in *Salmonella*/microsome, where none of the concentrations analysed of the roots extracts were able to increase the number of revertents/plate significantly. Nevertheless, leaf extract induced DNA damage in TA98 strain in the absence of S9, in the highest concentration evaluated, although in very low mutagenic potency. The *in vivo* experiments demonstrated that there was an increase in the number of comets and micronuclei observed, however, they were not statistically significant. The data obtained suggested that in spite of the low response in the induction of DNA damage in the experimental tested conditions, the extracts from *C. mollis*, especially the root one, possesses high toxicity and potential to induce apoptosis. Thus, the knowledge of the phytochemicals present in these extracts ally with a deeper investigation about the biological effects of *Coccoloba mollis* would be important to the scientific confirmation of the popularly proposed effects and to provide greater security to people that have being used this medicinal plant.

**Keywords:** Medicinal plants. *Coccoloba mollis*. Mutagenicity. Cytotoxicity. *In vitro*. *In vivo*.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	10
1.1 PLANTAS MEDICINAIS .....	10
1.2 MUTAGÊNESE .....	12
1.2.1 Sistemas – Teste .....	14
1.2.2 Ensaio de Citotoxicidade MTT .....	15
1.2.3 Ensaio de Detecção de Apoptose <i>In Situ</i> .....	16
1.2.4 Ensaios de Genotoxicidade / Mutagenicidade.....	18
1.2.4.1 Ensaio Salmonella / Microssoma ou Teste de Ames.....	18
1.2.4.2 Ensaio do Cometa ou Single Cell Gel Electrophoresis (SCGE) .....	21
1.2.4.3 Teste do Micronúcleo .....	23
1.3 <i>Coccoloba Mollis</i> , Família Polygonaceae .....	27
<b>2 JUSTIFICATIVA</b> .....	34
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	35
3.1 OBJETIVOS GERAIS .....	35
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	35
<b>4 ARTIGO 1</b> .....	36
<b>5 ARTIGO 2</b> .....	58
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	75
<b>ANEXOS</b> .....	90

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 PLANTAS MEDICINAIS

As plantas medicinais sempre tiveram um importante papel terapêutico na história da humanidade. Provavelmente a utilização das plantas como medicamento é tão antiga quanto o próprio aparecimento do homem sendo, portanto difícil determinar com exatidão as numerosas etapas na evolução desta arte de curar. Além de sua utilidade como agentes terapêuticos, os benefícios proporcionados pelos vegetais ao longo da história vão desde a sua utilização como corantes, inseticidas, fragrâncias, entre outros, até seu importante papel na nutrição humana, onde muitos dos fitoquímicos presentes nas plantas estão sendo cientificamente reportados como capazes de alterar a expressão gênica (MILNER, 2002; GO et al., 2005). De acordo com a Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuárias, EMBRAPA (2004), as plantas medicinais podem ser definidas como aquelas que apresentam uma ou mais substâncias químicas com ação medicamentosa capazes de interagir com o organismo humano e de outros animais, restabelecendo sua saúde e equilíbrio.

A fitoterapia é uma prática mundialmente significativa. Hostettmann e Marston (2002) mostraram que mais de 80% da população de países em desenvolvimento são totalmente dependentes das plantas na atenção primária à saúde e, mais de 25% dos medicamentos prescritos mundialmente derivam direta ou indiretamente das plantas.

No Brasil, as plantas medicinais são amplamente utilizadas na área rural e urbana (RATES, 2001). Em muitas regiões do território nacional, desde as menos favorecidas até as grandes cidades, as plantas medicinais são comercializadas em feiras livres, mercados populares e encontradas em quintais residenciais.

O interesse pela fitoterapia geralmente é motivado pelo seu uso tradicional e por sua origem natural. Os próprios usuários são os responsáveis pela validação das informações terapêuticas acumuladas ao longo dos séculos. As observações populares sobre o uso e a eficácia das plantas medicinais contribuem de forma relevante para a divulgação das virtudes terapêuticas dos vegetais prescritos com maior frequência e dos efeitos medicinais que produzem, mesmo sem o conhecimento dos seus constituintes químicos (MACIEL et al., 2002).

Até mesmo em países industrializados, onde a medicina convencional é

predominante, o uso das plantas como medicina complementar e alternativa cresce rapidamente (WHO, 2002). De acordo com Capasso et al. (2000), o aumento considerável na venda de fitoterápicos nestes países tem sido promovido por fatores como: (1) desenvolvimento de novas doenças, com complicações severas e que ainda não possuem um tratamento adequado; (2) a crença de que os fitoterápicos são inócuos, em contraste com as drogas convencionais; (3) a idéia de que sendo natural só pode ser bom; (4) a atenção especial dada aos fitoterápicos nos países ocidentais por movimentos ecológicos; e (5) a crença de que os fitoterápicos são naturalmente superiores às drogas sintéticas.

Apesar da comprovação científica dos efeitos benéficos das plantas medicinais, seu uso pela população deve ser realizado de maneira cautelosa. Efeitos adversos podem surgir devido à toxicidade intrínseca, à adulteração, substituição, contaminação, identificação errônea do material vegetal, falta de fiscalização e interações com outras drogas (RATES, 2001; ZHOU et al., 2004). Provavelmente, a deficiência de relatos sobre os efeitos adversos é reflexo da combinação de pouca divulgação e da natureza benigna da maioria das plantas utilizadas (FUGH-BERMAN, 2000).

Entretanto, a literatura nos apresenta também uma grande variedade de estudos com resultados muitas vezes contraditórios (CHAVEZ et al., 2006). Especial atenção tem sido dada à investigação de compostos naturais que atuam na prevenção do câncer. Contudo, alguns constituintes derivados de espécies medicinais, ou mesmo os preparados vindos destas espécies, podem ser bio-ativados para promover o desenvolvimento de tal doença (ZHOU et al., 2004; ROMERO-JIMÉNEZ et al., 2005).

Para garantir a eficácia terapêutica de um agente farmacológico, natural ou sintético, deve ser comprovado por meio de estudos farmacológicos, histo-patológicos e toxicológicos que o seu uso não traz agravos à saúde humana, sendo então necessário a avaliação de uma possível atividade genotóxica e/ou mutagênica deste agente. Esta prática é de especial importância no caso de produtos derivados das plantas medicinais, pois estas sintetizam substâncias tóxicas que, na natureza, possuem o papel de defesa contra a herbivoria e outros agentes patogênicos (KRICHER, 1997). Além disso, as plantas contêm inúmeros constituintes e seus extratos, quando testados, podem apresentar efeitos sinérgicos entre os diferentes princípios ativos devido a presença de compostos de classes ou estruturas diferentes contribuindo para a mesma atividade (MACIEL et al., 2002). A fitoterapia deve, então, ser acompanhada de estudos científicos que levem em consideração e correlacionem pesquisas de qualidade, eficácia e segurança (KHAN, 2006).

Deste modo, estudos de genotoxicidade e anti-genotoxicidade ajudam na

avaliação da segurança e efetividade dos produtos naturais (BAST et al., 2002). A avaliação da genotoxicidade / mutagenicidade dos agentes terapêuticos, naturais ou sintéticos, é recomendada por órgãos reguladores nacionais e internacionais (CNS, RESOLUÇÃO Nº251/97; OECD, 2001). A agência norte-americana *Food and Drug Administration*, FDA, sugere uma bateria de testes *in vitro* e *in vivo* para a compreensão do potencial genotóxico/mutagênico de um composto em questão: um teste para mutação gênica em bactéria; um teste citogenético *in vitro* para avaliação de danos cromossômicos em células de mamíferos ou um sistema que detecta mutações gênicas e efeitos clastogênicos (*Mouse Lymphoma tk Assay*); e, finalmente, um teste *in vivo* para detecção de danos cromossômicos em células hematopoiéticas de roedores (FDA, 1997). Os testes de genotoxicidade/mutagenicidade são, portanto, de particular importância, pois são capazes de detectarem compostos que induzem danos genéticos diretamente ou indiretamente por diversos mecanismos.

## 1.2 MUTAGÊNESE

A Mutagênese ou também denominada Genética Toxicológica corresponde à ciência que estuda o processo de indução de danos no DNA pela ação de agentes químicos, físicos e biológicos. Este dano é usualmente medido como mutações, aberrações cromossômicas, quebras de fitas do DNA, aductos ou por interferências no sistema de reparo do dano (ZEIGER, 2001). Os estudos nesta área têm sido usados no acesso da mutagenicidade de agentes ambientais, farmacêuticos e químicos há mais de trinta anos, sendo muitas de suas atividades focadas no desenvolvimento de novos testes, padronização de protocolos, geração de base de dados e estudos inter-laboratoriais de validação de resultados.

A avaliação da mutagenicidade ganha cada vez mais importância à medida que a sociedade se desenvolve e o número de substâncias estranhas ao organismo humano cresce. Esses xenobióticos podem interagir de diversas formas com o homem, sendo benéficos, prejudiciais ou indiferentes frente ao contato. Por isso é imprescindível identificar os agentes potencialmente mutagênicos, teratogênicos ou carcinogênicos e estabelecer normas para o seu uso (REIFFERSCHIED; HEIL, 1996). Observações epidemiológicas e estudos adicionais em animais e outros sistemas-teste mostram que inúmeros agentes aos quais estamos constantemente expostos são capazes de induzir danos no DNA (WOGAN et al.,

2004). Evidências crescentes sugerem que o dano no DNA, expresso principalmente como mutações, está envolvido na indução de muitos tipos de câncer (BARTSCH; TOMATIS, 1983; SARASIN, 2003). Além de seu papel na carcinogênese, as mutações podem ainda possuir papel crítico no processo de envelhecimento e no desenvolvimento de doenças auto-imune e crônico-degenerativas (MORLEY; TURNER, 1999; FENECH, 2000; DE FLORA; FERGUNSON, 2005).

O processo de carcinogênese é resultante da acumulação de múltiplas mutações que culminam na insensibilidade de controle da célula cancerígena pelo ambiente celular local e pelo organismo como um todo (SARASIN, 2003). De acordo com Hanahan e Weinberg (2000), a progressão para o tumor maligno é governada por seis alterações essenciais na fisiologia celular: auto-suficiência nos sinais de fatores de crescimento, insensibilidade aos sinais de fatores inibitórios de crescimento, evasão da apoptose, potencial replicativo ilimitado, sustento da angiogênese, e invasão tecidual e metástase. Esses eventos são tradicionalmente separados em três fases: iniciação, promoção e progressão. Na fase de iniciação ocorre o dano ao DNA. A fase de promoção é aquela onde promotores de tumor agem como mitógenos, induzindo a expansão de clones das células iniciadas. A progressão é caracterizada pelo desenvolvimento irreversível de mudanças macroscópicas e microscópicas pelas células já alteradas genotípica e fenotipicamente (GESCHER et al., 2001). Alguns autores sugerem ainda uma quarta fase, a invasão, onde os tumores evoluem com aumento nos níveis de malignidade (ALBERTS et al., 1999).

De acordo com as informações acima, podemos dizer que o mecanismo de mutagênese (e a conseqüente instabilidade genômica) na fase de iniciação está intrinsecamente ligado ao processo carcinogênico das fases seguintes. Dados publicados mostram que a maioria dos tumores sólidos são geneticamente instáveis em pelo menos uma das fases do processo de carcinogênese (SARASIN, 2003). Mutações de ponto, aberrações cromossômicas como translocações, deleções e ampliações, metilação aberrante do DNA, modificações das histonas (NELSON et al., 2004), instabilidade em regiões de microssatélite, silenciamento e/ou perda de heterozigosidade de genes supressores de tumor e aneuploidia têm sido propostos como possíveis importantes passos iniciadores (FENECH, 2002).

Estudos de mutagenicidade e carcinogênese apresentam grande correlação positiva, mostrando que a maioria dos carcinógenos são mutagênicos (McCANN et al., 1975). Entretanto, mecanismos indiretos de genotoxicidade também existem e podem ser definidos como interações com alvos diferentes do DNA, que resultam em efeitos genotóxicos (KIRSCH-VOLDERS et al., 2003). Os carcinógenos não-genotóxicos podem ainda ser

definidos como aqueles que não apresentam mutagenicidade em teste de avaliação da toxicidade genética (CHOY, 2001). Considerando esta definição, a metilação do DNA pode ser considerada um processo não-genotóxico, que causa alterações na expressão gênica, na ausência de mutação (CHOY, 2001). Segundo este mesmo autor, o desencadeamento acentuado da proliferação celular (por encurtar o tempo de carcinogênese) e da proliferação dos peroxissomos (resultando em aumento dos níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e conseqüentemente dos danos oxidativos) também são exemplos destes mecanismos.

### 1.2.1 Sistemas – Teste

Diversos ensaios são utilizados para a avaliação da genotoxicidade / mutagenicidade de um agente e estes podem ser aplicados em uma grande variedade de organismos-teste, desde microrganismos até plantas, animais experimentais e humanos, bem como em sistemas de cultura de células.

Nos últimos anos, o uso da cultura de células e de tecidos na pesquisa e na indústria vem crescendo rapidamente, principalmente devido à tendência de evitar o uso de animais para experimentação (JONES; STACEY, 2001). A cultura de células é amplamente utilizada em laboratórios de todo o mundo para examinar vias metabólicas e elucidar mecanismos envolvendo a transdução de sinais, regulação da expressão gênica, proliferação e morte celular (HALLIWELL, 2003). Os estudos *in vitro* com células de mamíferos são amplamente utilizados na detecção de agentes mutagênicos ou anti-mutagênicos e apresentam diversas vantagens tais como a facilidade de padronização das condições experimentais (densidade populacional, pH, temperatura, composição do meio de cultivo, entre outras), a possibilidade de aplicação do tratamento em qualquer fase do ciclo celular, além de serem ensaios econômicos e de boa reprodutibilidade (RABELLO-GAY; RODRIGUES, 1991). Em especial, linhagens celulares hepáticas, tais como HTC, HepG2 e culturas primárias de hepatócitos são de grande utilidade em estudos de genotoxicidade e mutagenicidade, uma vez que o fígado é o principal sítio de metabolização de xenobióticos (MERSH-SUNDERMANN et al., 2004) e muitos desses necessitam ser metabolizados para originar compostos mutagênicos (ZEIGER, 2001). Assim sendo, tais células, mesmo em condições de cultura e em níveis de expressão variáveis, apresentam ainda enzimas de fase I e fase II do metabolismo de drogas (CASTELL et al., 1997; WILKENING et al., 2003; VALENTIN -

SEVERIN et al., 2003).

Apesar da alternativa do uso de células metabolizadoras, da adição de metabolização exógena aos sistemas *in vitro* e embora estes mostrem alta concordância com estudos em animais (McCANN et al., 1975), os ensaios *in vitro* ainda apresentam algumas limitações quando comparados ao sistema *in vivo* como a dificuldade de simular a farmacocinética de absorção, distribuição, metabolismo e excreção *in vivo*, perda de interações célula-matriz necessárias para a manutenção do fenótipo diferenciado, além de que a estabilidade metabólica *in vitro* depende somente da atividade das células-alvo enquanto que a distribuição sistêmica que ocorre *in vivo* coloca o composto sob a influência de diferentes tecidos (FRESHNEY, 2001). De acordo com KRISHNA; HAYASHI (2000), os sistemas *in vivo* são especialmente relevantes no acesso ao perigo genético, uma vez que permitem considerar fatores do metabolismo *in vivo*, farmacocinética e processos de reparo do DNA.

### **1.2.2 Ensaio de Citotoxicidade MTT**

A citotoxicidade pode ser considerada como o potencial de um composto de induzir a morte celular (EISENBRAND et al., 2002). A resposta celular a um efeito tóxico pode ser reversível, quando resultante de privação de nutrientes ou fatores de crescimento ou regulada positiva ou negativamente por um regulador de crescimento; ou irreversível, quando as células entram em apoptose, senescência ou se diferenciam (FRESHNEY, 2001). Os testes de citotoxicidade *in vitro* são úteis e necessários para definir a citotoxicidade basal e permitem o controle do ambiente físico-químico e fisiológico, além de darem consistência à amostra e resultados reproduzíveis quando linhagens celulares bem caracterizadas são empregadas (FRESHNEY, 2001; EISENBRAND et al., 2002). Ainda segundo Eisenbrand et al. (2002) os testes de citotoxicidade também são de grande valia para definir os limites de concentrações a serem testadas em experimentos de indução de mutações ou apoptose. De acordo com Honma e Sofuni (2001), para avaliar o potencial mutagênico de uma substância apropriadamente, é necessário testar doses variadas e estar ciente de que a citotoxicidade excessiva pode levar a resultados falso-positivos, uma vez a citotoxicidade pode estar, eventualmente, associada à indução de danos cromossômicos (MULLER et al., 2001).

Diferentes parâmetros podem ser utilizados na avaliação da citotoxicidade.

Geralmente esses testes examinam *endpoints* que indicam efeitos em membranas celulares de organelas, colapso da barreira de permeabilidade celular, função mitocondrial reduzida, alterações na morfologia e replicação das células (HODGSON et al., 2004).

Um exemplo destes testes é o ensaio MTT. Proposto por Mosmann em 1983, ele é um dos mais empregados e um dos mais sensíveis testes para a detecção de citotoxicidade após a exposição das células a substâncias tóxicas (FOTAKIS; TIMBRELL, 2006). Testes colorimétricos como este, apresentam vantagens como sua rapidez e precisão (MOSMANN, 1983).

O método envolve a conversão, pelas células, do MTT [3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] um sal tetrazolium de coloração amarela em um formazan de coloração roxa. Tal reação geralmente é atribuída à atividade das mitocôndrias, porém o exato mecanismo da redução do MTT ainda não está bem esclarecido (VELLONEN et al., 2004). Como o produto formado é impermeável às membranas celulares, este se acumula nas células vivas. Após a exposição das células ao composto teste e ao período de incubação das mesmas em contato com o MTT, as amostras passam pelo leitor de ELISA, onde são medidas espectrofotometricamente.

### **1.2.3 Ensaio Para Detecção de Apoptose *In Situ***

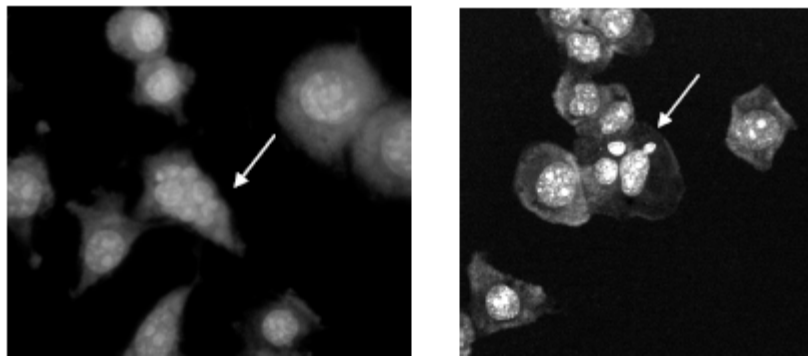
Como descrito anteriormente, a resposta da célula a um efeito tóxico pode ser reversível ou irreversível. A distinção entre a citotoxicidade e danos celulares reversíveis deve ser apropriadamente avaliada para que a interpretação dos dados de estudos *in vivo* seja facilitada (VALENTIN et al., 2000). Para isso, a indução da apoptose, por exemplo, pode ser investigada através de diversos parâmetros: alterações na morfologia celular, rearranjos na membrana, fragmentação do DNA, ativação de caspases, liberação do citocromo c da mitocôndria, entre outros (EISENBRAND et al., 2002).

O termo apoptose foi utilizado pela primeira vez em 1972 por Kerr e seus colaboradores para descrever uma forma de morte celular morfologicamente distinta (ELMORE, 2007). A morte celular por apoptose foi inicialmente identificada com base nas mudanças fisiológicas reproduzidas com grande fidelidade em diferentes tipos celulares quando expostas a um estímulo de morte. Essas mudanças incluem condensação do citosol e da cromatina nuclear, fragmentação celular em corpúsculos que são fagocitados pelas células

vizinhas e exposição do resíduo de fosfatidilserina na superfície externa da membrana plasmática (PLENCHETTE et al., 2004). Embora a apoptose possua importante papel durante o processo de desenvolvimento dos organismos, esta se não regulada corretamente pode resultar em patologias associadas ao seu desencadeamento excessivo ou diminuído: anormalidades no desenvolvimento, doenças auto-imunes, neurodegenerativas e câncer (ELMORE, 2007).

A identificação da apoptose por análise das alterações morfológicas, por exemplo, ainda constitui um procedimento padrão devido a sua simplicidade, baixo custo e precisão (PLENCHETTE et al., 2004). A técnica faz uso de corantes tais como Hoechst 33342 ou Acridine Orange, que penetram na célula e coram seu DNA. Em contraste com as células normais, as células apoptóticas terão a cromatina condensada e fragmentada uniformemente coradas por estes corantes (PLENCHETTE et al., 2004; WYLLIE, 2008) (Figura 1).

Como dito anteriormente, existe uma grande variedade de testes para a detecção da apoptose. Estes envolvem métodos relativamente simples e baratos que utilizam apenas microscopia, até métodos mais onerosos, que fazem uso de *kits* próprios e aparelhagem mais sofisticada, todos com suas vantagens e desvantagens. É, portanto de responsabilidade do pesquisador avaliar qual a melhor combinação de testes que será útil à sua pesquisa.



**Figura 1** – Células HTC após tratamento com os extratos da *C. mollis*. Coloração: Acridine Orange. Microscopia de fluorescência, objetiva de 100x. Setas indicam células apoptóticas.

## 1.2.4 Ensaios de Genotoxicidade / Mutagenicidade

Um grande número de testes *in vitro* e *in vivo* tem sido desenvolvido para a detecção de danos no DNA. Os principais objetivos destes testes é a detecção de mutações em linhagens celulares germinativas, devido ao seu possível envolvimento no desempenho reprodutivo e futura geração de doenças genéticas; e a identificação de mutações somáticas, devido à sua já estabelecida relação com o desenvolvimento de doenças como o câncer (EISENBRAND et al., 2002).

Dentre os testes mais empregados e amplamente aceitos para investigação de substâncias que causam dano genético estão os ensaios *Salmonella*/microsoma ou Teste de Ames (MORTELMANS; ZEIGER, 2000), o Ensaio do Cometa (WITTE et al., 2007; BURLINSON et al., 2007); e o Teste do Micronúcleo (FENECH, 1999; KRISHNA; HAYASHI, 2000).

### 1.2.4.1 Ensaio *Salmonella* / Microsoma ou Teste de Ames

Entre os ensaios microbianos que utilizam bactérias, o mais comumente utilizado tem sido o Teste de Ames, principalmente por sua simplicidade, baixo custo, sensibilidade, reprodutibilidade, versatilidade e alto valor preditivo para carcinogenicidade em roedores quando uma resposta mutagênica é obtida (RABELLO-GAY; RODRIGUES, 1991; MORTELMANS; ZEIGER, 2000). O teste *Salmonella* / microsoma pode ser aplicado para a avaliação da qualidade do ar, esgoto, sedimentos, efluentes do processo industrial, água para consumo humano, tecidos animais, solos, além de produtos químicos, naturais, sintéticos, fitoterápicos (SBMCTA, 2004). É parte das baterias de ensaios internacionalmente propostas para registro de medicamentos, outras drogas, formulações químicas, incluindo as substâncias ou misturas com ampla utilização na agricultura, além de ser utilizado em estudos para elucidação de mecanismos de mutagênese e anti-mutagênese e na avaliação de efeitos sinérgicos de misturas de compostos (UMBUZEIRO; VARGAS, 2003).

O teste *Salmonella* / microsoma ou teste de Ames, desenvolvido por Bruce Ames e seus colaboradores no final dos anos de 1960 e início de 1970, é um dos mais reconhecidos e executados na área de genética toxicológica. Durante mais de vinte anos os

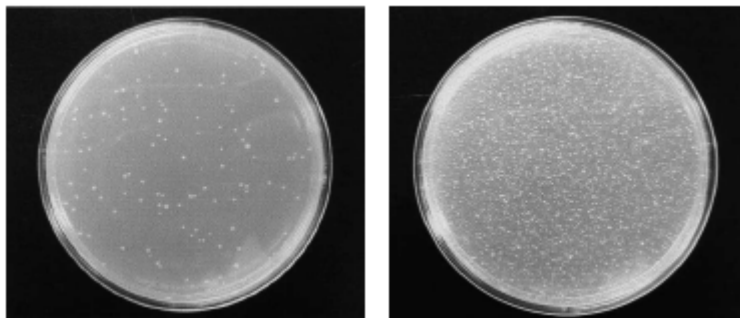
procedimentos do ensaio foram firmemente estabelecidos e os resultados extensivamente validados (CHOY, 2001). O teste avalia a capacidade de indução de dano genético que leva a mutações gênicas através da reversão do fenótipo histidina negativo (his-) para histidina positivo (his+) das diferentes linhagens de *Salmonella typhimurium*, na presença e ausência de sistema de metabolização (fração microsossomal S9) (JOSEPHY, 1997).

As linhagens de *Salmonella* usadas no ensaio pertencem ao grupo de enterobactérias capazes de produzir azoredutase e nitroredutase, especialmente construídas para detectar mutações do tipo deslocamento de quadro de leitura ou substituição de pares de base no DNA (UMBUZEIRO et al., 2005). As linhagens sofrem mutações nos genes responsáveis pela biossíntese da histidina e como resultado não conseguem produzir este aminoácido, sendo que cada uma dessas mutações é projetada para responder aos mutágenos que agem por mecanismos diferentes, o que torna a combinação de linhagens de *Salmonella* uma ferramenta importante na elucidação do mecanismo de ação mutagênica de diversos compostos (MORTELMANS; ZEIGER, 2000). As linhagens TA98 e TA100 são comumente utilizadas para estudos de triagem, mostrando eficiência na detecção de grande número de agentes mutagênicos (SBMCTA, 2004). A mutação *hisD3052*, presente em TA98 ocorre na codificação do gene para histidinol desidrogenase e afeta a leitura correta de uma seqüência próxima constituída de oito resíduos CG -CGCGCGCG- repetitivos (UMBUZEIRO; VARGAS, 2003). A reversão desta mutação é induzida por vários mutágenos que ocasionam erros de leitura como o 2-nitrofluoreno e vários derivados aromáticos nitrosos (MORTELMANS; ZEIGER, 2000). Já a mutação *hisG46*, presente em TA100, codifica o gene para a primeira enzima da biossíntese da histidina. A mutação é resultante da substituição de uma leucina (GAG/CTC) por uma prolina (GGG/CCC) sendo, portanto, revertida por mutações que causam substituição de pares de bases em um dos pares GC (MORTELMANS; ZEIGER, 2000).

Diversos protocolos podem ser utilizados para a realização do teste, sendo os mais empregados os métodos de incorporação em placas, o de pré-incubação e o de microsusensão (UMBUZEIRO; VARGAS, 2003). Estes diferentes protocolos e a construção de novas linhagens de *Salmonella*, com mutações adicionais àquelas no *operon* da histidina, aumentaram a sensibilidade do teste, permitindo que este avalie uma maior quantidade de agentes, incluindo gases e compostos voláteis. Em revisão feita por MORTELMANS; ZEIGER (2000), os autores descrevem detalhadamente os protocolos para execução do ensaio e interpretação dos resultados:

- O método de incorporação em placas consiste em adicionar as linhagens de *Salmonella* e a amostra a ser testada em uma placa de ágar mínimo (suplementado com biotina e traços de histidina) na presença e ausência de sistema de ativação metabólica (fração S9);
- O método de pré-incubação é uma modificação do ensaio de incorporação em placas e envolve a exposição das linhagens, da substância teste, do tampão ou da mistura S9 por um curto período de tempo (usualmente 30 minutos) a 37°C em um pequeno volume de mistura (0,5 mL) antes do plaqueamento em ágar mínimo. Acredita-se que os metabólitos mutagênicos de vida curta têm uma maior possibilidade de interagir com as linhagens em um pequeno volume de mistura pré-incubada se comparado com o plaqueamento imediato. Além disso, o menor volume possibilita maior concentração de S9 e co-fatores;
- No protocolo de microsuspendição, também denominado teste de Kado, as culturas são concentradas 10 vezes, para uso no teste de pré-incubação. Esta metodologia é interessante quando se dispõe de pouca quantidade de amostra, pois se acredita que o maior número de bactérias aumente a detecção dos metabólitos mutagênicos.

Os resultados do ensaio devem ser submetidos à análise de variância (ANOVA), seguida de análise de regressão linear, preferencialmente em programa estatístico próprio (exemplo Salanal®) (UMBUZEIRO; VARGAS, 2003). Para todos os protocolos, o número de revertentes no controle negativo é a taxa de reversão espontânea obtida nas condições do ensaio e normalmente os resultados são expressos em número de revertentes por placa. Uma amostra é considerada positiva quando apresenta ANOVA e efeito dose-resposta significativo (SBMCTA, 2004). A figura abaixo ilustra a resposta observada no ensaio para o controle negativo e por mutagênese induzida.



**Figura 2** – Resposta observada no teste de Ames. À esquerda, controle negativo; à direita mutagênese induzida por agente químico, apresentando maior número de colônias revertentes

**Fonte:** Mortelmans; Zeiger, 2000.

#### 1.2.4.2 Ensaio do Cometa ou *Single Cell Gel Electrophoresis* (SCGE)

O Ensaio do Cometa ou *Single Cell Gel Electrophoresis* (SCGE) é um método rápido e sensível para a detecção de danos primários no DNA que tem sido amplamente utilizado na Genética Toxicológica por ser um teste relativamente barato, simples, flexível, de rápidos resultados, no qual um pequeno número de células por amostra e pequenas quantidades da substância teste são suficientes para conduzir um experimento (COLLINS et al., 1996; TICE et al., 2000; WITTE et al., 2007). Além do seu amplo uso na investigação genotóxica *in vitro* e *in vivo*, biomonitoramento humano, epidemiologia molecular, ecogenotoxicologia, o teste do cometa constitui uma valiosa ferramenta para a investigação dos aspectos fundamentais de danos no DNA e seus mecanismos de reparo (COLLINS, 2004). O SCGE vem sendo considerado uma técnica útil no biomonitoramento humano, pois este pode ser aplicado em células não-proliferativas e em células de tecidos considerados como o primeiro sítio de contato das substâncias mutagênicas, ao contrário dos testes citogenéticos, muitas vezes limitados aos linfócitos circulantes e dependentes de populações celulares proliferativas (KASSIE et al., 2000). Witte et al., (2007) propõem que o ensaio seja utilizado como uma alternativa aos ensaios citogenéticos na triagem de drogas, por ter as vantagens já descritas acima, pela menor ocorrência de resultados falso-positivos associados com o excesso de toxicidade e pela possibilidade de automatização de alguns passos da técnica. O teste do cometa também está sendo bastante usado em estudos nutricionais, especialmente na investigação do efeito protetor de componentes da dieta frente

a danos oxidativos e por isso é considerado por alguns pesquisadores como um biomarcador ideal para estudos de efeitos da nutrição sobre o câncer (WASSON et al., 2008).

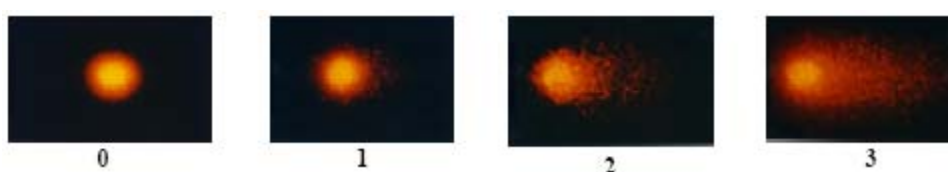
Rydberg e Johanson, em 1978, foram os primeiros pesquisadores que quantificaram danos diretamente no DNA de células individuais, ao lisarem as células embebidas em agarose em condições alcalinas (GONTIJO; TICE, 2003; WITTE et al., 2007). Anos mais tarde, Östling e Johanson (1984) descreveram uma versão modificada de detecção de danos em células individuais, com a introdução da eletroforese e sob pH neutro, onde as células com aumento de danos (neste caso, quebras de fita dupla) apresentam aumento na migração de fragmentos do DNA em direção ao ânodo. Em 1988, Singh et al. introduziram a eletroforese em pH alcalino (pH >13), o que tornaria a técnica mais sensível e a mais utilizada pelos pesquisadores da área (TICE et al., 2000). Nestas condições, a técnica permite detectar o mais amplo espectro de dano ao DNA - quebras de fita simples e dupla, danos em sítios álcali-lábeis e ainda, sob certas condições *crosslinks* DNA-DNA, DNA-proteína, que (na ausência de outras lesões) aparecem como uma diminuição da migração do DNA quando comparado aos controles (HARTMANN et al., 2003). A introdução de tratamentos enzimáticos torna o ensaio ainda mais específico e sensível. Neste caso, é introduzida uma etapa extra de digestão dos nucleóides com enzimas que reconhecem tipos particulares de danos e ocasionam uma quebra (COLLINS, 2004). Pirimidinas oxidadas podem ser detectadas com o uso da endonuclease III (COLLINS et al., 1993), a oxidação de purinas é normalmente detectada com o uso da formamidopirimidina DNA-glicosilase (FPG), enquanto que os dímeros de pirimidina induzidos por UV são detectados com a endonuclease V do bacteriófago T4 (TICE et al., 2000; COLLINS, 2004). É importante ressaltar que o ensaio detecta lesões genômicas que após processadas podem ou não resultar em mutações, ou seja, o dano detectado pelo teste do cometa é passível de reparo (GONTIJO; TICE, 2003).

O Ensaio do Cometa pode ser conduzido em qualquer tecido desde que as células possam ser isoladas. É mais comumente aplicado em células animais, entretanto alguns métodos têm sido desenvolvidos para aplicação do teste em células vegetais (GICHNER; PLEWA, 1998). Muitas variáveis técnicas podem afetar a sensibilidade do teste, tais como a natureza química e o mecanismo de ação do agente mutagênico, a concentração e quantidade de agarose de baixo ponto de fusão, composição da solução de lise, tempo de lise, tempo de desnaturação alcalina do DNA, composição e temperatura do tampão de eletroforese, as condições de corrida, a coloração do DNA, entre outros (SPEIT; HARTMANN, 1999; SPEIT et al., 1999).

A análise dos cometas gerados pode ser feita visualmente ou de maneira

automatizada, com programas computacionais próprios. De acordo com Collins (2004), existe grande concordância entre os resultados obtidos pelas duas maneiras de análise.

A classificação visual dos cometas normalmente é feita de acordo com o descrito por Kobayashi, (1995). Estes são divididos em quatro classes, de acordo com a extensão do dano gerado, em: *cometa classe 0* – nucleóides que não apresentam cauda; *cometa classe 1* – nucleóides com cauda menor que o diâmetro do nucleóide; *cometa classe 2* – nucleóides com cauda de tamanho entre 1 a 2 vezes o diâmetro do nucleóide; e *cometa classe 3* – nucleóides com cauda 2 vezes maior que o diâmetro do nucleóide (Figura 3).



**Figura 3** – Critério de classificação para a análise do Ensaio do Cometa. Da esquerda para direita, cometas de classe 0, 1, 2 e 3. Coloração: Brometo de Etídeo. Microscopia de fluorescência, objetiva de 40x. Foto de Luiz, 2002.

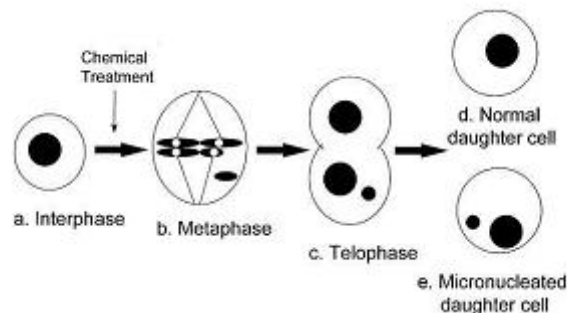
#### 1.2.4.3 Teste do Micronúcleo

O Teste do Micronúcleo foi originalmente desenvolvido por Schmid et al. em 1971 e então modificado por Heddle (1973) como uma alternativa aos ensaios citogenéticos tradicionais. O método apresenta vantagens como a simplicidade, rapidez e baixo custo (SCHIMID, 1975). O ensaio foi desenvolvido primeiramente em sistema-teste *in vivo*, em células de medula óssea de camundongos, porém atualmente é aplicado em vários tipos celulares, em sistemas *in vitro*, *in vivo* e *ex vivo*. A versão *in vivo* do ensaio é considerado o teste mais amplamente utilizado para a detecção de agentes clastogênicos e aneugênicos, sendo internacionalmente aceito como parte da bateria de testes recomendados para avaliação do potencial mutagênico, para o registro de novos produtos químicos que entram no mercado mundial (CHOY, 2001; SBMCTA, 2004).

A formação do micronúcleo é amplamente usada na epidemiologia molecular como um biomarcador de danos cromossômicos e instabilidade genômica (IARMARCOVAI et al., 2008). Além de sua aplicação em estudos de ecotoxicologia, na avaliação de novos fármacos, no monitoramento de indivíduos expostos ocupacionalmente a

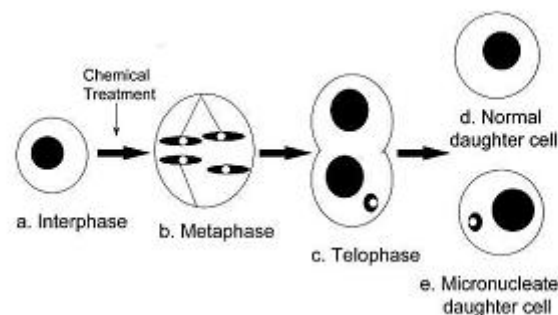
agentes potencialmente mutagênicos, no estudo dos mecanismos de ação do agente mutagênico estudado (SALVADORI et al., 2003), diversos laboratórios o utilizam como uma ferramenta para a avaliação de fatores ambientais, genéticos e estilo de vida sobre a estabilidade genômica das populações humanas, com especial atenção na avaliação de risco para o câncer (FENECH et al., 1999).

Os micronúcleos são resultantes de dois fenômenos básicos nas células mitóticas: quebra cromossômica (clastogênese) e disfunção do aparelho mitótico (aneugênese), sendo formados pelos cromossomos acêntricos ou fragmentos cromatídicos e cromossomos inteiros ou cromátides que se atrasam na anáfase e são excluídos do núcleo-filho na telófase (FENECH, 2000) (Figuras 4 e 5). A distinção do micronúcleo contendo cromossomos inteiros de um contendo fragmentos cromossômicos acêntrico pode ser feita utilizando-se hibridização *in situ* fluorescente (FISH) com sondas de regiões pericentroméricas (MATEUCA et al., 2006).



**Figura 4** – Formação de célula micronucleada por clastogênese, contendo fragmento cromatídico acêntrico.

**Fonte:** Aardema; Kirsch-Volders, 2001.



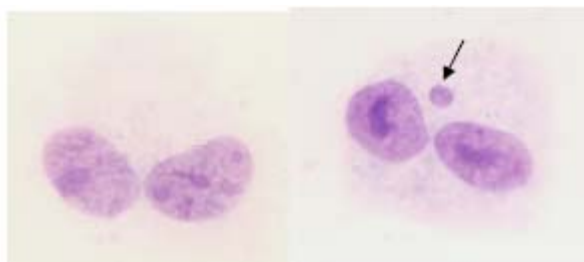
**Figura 5** – Formação de célula micronucleada por aneugênese, contendo cromossomo inteiro.

**Fonte:** Aardema; Kirsch-Volders, 2001.

O ensaio do micronúcleo *in vitro* com bloqueio de citocinese (MNCtB), desenvolvido por Fenech e Morley em 1985, tornou-se um dos testes citogenéticos padrão para a análise da frequência de micronúcleos em células humanas (FENECH, 2006a) e agências reguladoras já o incorporaram na bateria de testes recomendados para o acesso ao potencial mutagênico de novos agentes (OECD, 2007). Além da análise do micronúcleo, outros parâmetros podem ser investigados na mesma cultura, na mesma lâmina. A viabilidade celular pode ser mensurada através da análise das células necróticas e apoptóticas; a condição mitótica através da contagem das células mono, bi e multinucleadas e posterior cálculo do índice de divisão nuclear; e finalmente, a instabilidade cromossômica ou extensão do dano, através da análise da presença de micronúcleo, ponte nucleoplasmática e brotos nucleares (FENECH, 2006a).

O MNCtB permite a análise dos micronúcleos após a primeira divisão celular, certificando que o dano ocorrido é decorrente do tratamento experimental à que as células foram submetidas. A adição de citocalasina-B (Cyt-B) à cultura permite identificar tais células devido à presença dos dois núcleos (FENECH, 2000). Esta substância inibe os microfilamentos de actina e impede a polimerização dos mesmos na placa equatorial formada no final da telófase; desta forma observa-se uma cariocinese com ausência de citocinese. O uso da Cyt-B já foi motivo de debate entre os pesquisadores. Alguns já evidenciaram que seu uso pode interferir na indução de micronúcleos por agentes que afetariam o fuso mitotótico (AARDEMA; KIRSCH-VOLDERS, 2001), entretanto, os resultados de um estudo interlaboratorial revelaram que o uso da Cyt-B é a maneira mais eficiente de minimizar resultados falso-negativos (FENECH, 2006b).

Alguns critérios devem ser seguidos para a seleção das células binucleadas e para a identificação do micronúcleo (Figura 6) (FENECH, 2000): as células devem ser binucleadas; os dois núcleos devem ter a membrana intacta e devem estar situados dentro do mesmo limite citoplasmático; os dois núcleos devem ter tamanhos aproximadamente iguais e mesma intensidade de coloração; os micronúcleos devem possuir morfologia idêntica a do núcleo principal e mesma coloração (porém ocasionalmente é mais intensa); os micronúcleos são não-refringentes; não devem estar ligados a um dos núcleos principais; não podem estar sobrepostos a um dos núcleos principais; e o diâmetro deve variar de 1/16 até 1/3 do diâmetro do núcleo principal.

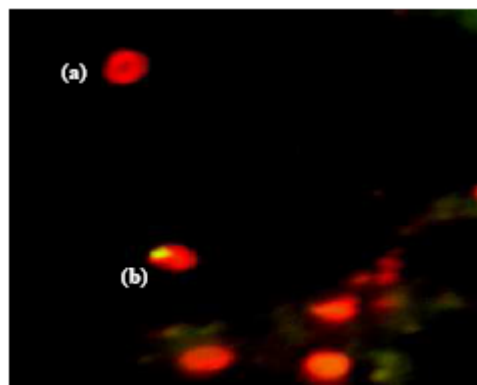


**Figura 6** – Células binucleadas sem micronúcleo (esquerda) e com micronúcleo (seta) (direita). Coloração: Giemsa 5%. Microscopia óptica, aumento de 400x.

**Fonte:** Luiz, 2002.

Como descrito anteriormente, o ensaio do micronúcleo *in vivo* é amplamente utilizado na detecção de agentes clastogênicos e aneugênicos. O dano cromossômico é mensurado em células de medula óssea por constituir uma população celular de rápida proliferação e ser mais suscetível à indução de danos (ZEIGER, 2001). Os micronúcleos são avaliados em hemáceas jovens, pois quando os eritroblastos expõem seus núcleos e se transformam em eritrócitos, estes permanecem no citoplasma, onde são facilmente identificados devido à sua morfologia arredondada e coloração característica (SCHIMID, 1975).

A frequência de micronúcleos também é usualmente verificada no sangue periférico dos animais. Neste caso, os reticulócitos são as células indicadas para a análise. Segundo HAYASHI *et al* (1990), a população celular é mais uniforme e fácil de analisar e uma pequena quantidade de células sanguíneas pode ser retirada repetidamente da cauda do roedor sem a necessidade de sacrificá-lo. A coloração feita com acridina orange permite a distinção dos reticulócitos sem micronúcleo, ricos em RNA e que emitem fluorescência vermelha, dos reticulócitos com micronúcleo, que além da coloração vermelha, apresentarão em seu citoplasma o DNA contido no micronúcleo, com coloração amarelo-esverdeado (Figura 7).



**Figura 7** – Reticulócito sem micronúcleo (a) e com micronúcleo (b).  
 Coloração: laranja de acridina.  
 Microscopia de fluorescência;  
 aumento de 400x.

**Fonte:** Marcarini, 2005.

### 1.3 *COCCOLOBA MOLLIS*, FAMÍLIA POLYGONACEAE

A *Coccoloba mollis* Casaretto (Polygonaceae) é uma espécie vegetal popularmente pouco conhecida, mas que tem sido utilizada como fitoterápico em Londrina, PR. Esta espécie está registrada no “*Guia Homeopático da Farmácia Q. curatun*” com o nome de “*Erva da memória*”, e tem sido utilizada em casos de falta de memória, estresse, insônia, anemias, queda de visão e impotência sexual.

O gênero *Coccoloba* distribui-se desde o México, sul dos Estados Unidos até o sul da América do Sul. No Brasil estão presentes 45 espécies, 23 das quais ocorrem na Amazônia (MELO, 2004).

A *Coccoloba mollis* (Figura 8), popularmente conhecida como folha-de-bolo ou falso- novateiro, cauaçu ou pau-de-vassoura, ocorre em cerradões e mata semidecídua da bacia do Paraná, desde o estado de Goiás até o Triângulo Mineiro e Paraná (MORS et al., 2000; LORENZI, 2002).



**Figura 8** – *Cocoloba mollis*.

**Fonte:** Lorenzi, 2002.

A pesquisa bibliográfica realizada até o momento no *Chemical Abstract* (CA) e no *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) indica a ausência de literatura científica sobre esta espécie.

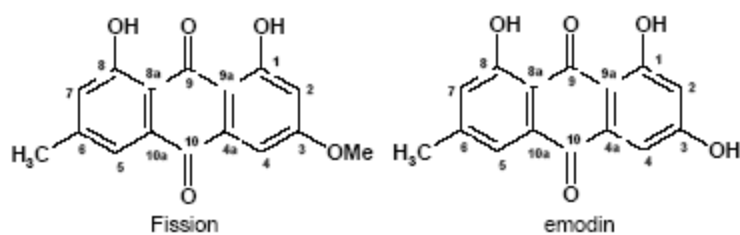
As espécies do gênero *Cocoloba* têm sido popularmente usadas no Brasil como adstringente, no tratamento da febre, diarreia, gonorréia, hemorróidas, problemas menstruais e hemorragias uterinas (MORS et al., 2000; COTA et al., 2003). Os principais constituintes químicos já identificados em espécies deste gênero são: triterpenos (acetato de lupeol, betulina, taraxenona, ácido betulico, fridolina,  $\alpha$ -amirina, lupeol); flavonóides (miricetina-3-ramnosídeo, quercetina, quercetina-3-ramnosídeo, campferol); antraquinonas (éter 3-metílico da emodina, crisofanol, reina, emodina); esteróides (estigmasterol); aromáticos e derivados (ácido gálico, catequinas, éster etílico do ácido gálico, roileanona) (FERREIRA<sup>1</sup>; COTA et al., 2003).

*Cocoloba uvifera* L. apresenta como principais constituintes ácidos carboxílicos, ésteres e aldeídos (SHAW et al., 1992 apud COTA et al., 2003). Ácido gálico, epigalocatequina galato, miricetina-3-o-ramnosídeo e triterpenos já foram isolados de *Cocoloba dungandiana*, e  $\beta$ -sitosterol,  $\beta$ -lupeol, taraxerona, ácido ursólico e betulico de *Cocoloba excoriata* L. (COMPAGNONE et al., 1995 apud COTA et al., 2003; DAN; DAN apud COTA et al., 2003).

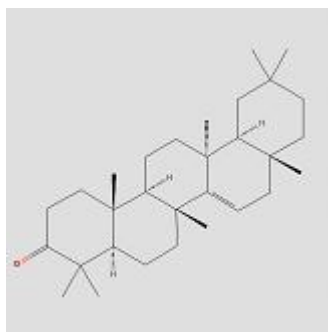
---

<sup>1</sup>FERREIRA DT (comunicação pessoal). Profa. Dra. Dalva Trevisan Ferreira, responsável pelo Laboratório de Pesquisas em Moléculas Bioativas, pertencente ao Departamento de Química da Universidade Estadual de Londrina, UEL e coordenadora do estudo fitoquímico dos extratos da *Cocoloba mollis*.

A caracterização dos constituintes químicos dos extratos etanólicos obtidos das folhas e raízes da *Coccoloba mollis* aqui testados ainda estão em andamento. Resultados preliminares demonstraram a presença de duas antraquinonas (emodina e fissiona; Figura 9) no extrato da raiz, enquanto que hidrocarbonetos, ésteres de cadeia longa e o triterpeno taraxerona (Figura 10) foram caracterizados no extrato da folha (de BARROS et al., 2007; FERREIRA et al., 2007).



**Figura 9** – Estrutura química das antraquinonas identificadas no extrato etanólico da raiz de *C. mollis*.



**Figura 10** – Estrutura química do triterpeno identificado no extrato etanólico da folha de *C. mollis*.

Fonte: NCBI, 2008

A atividade antimicrobiana destes extratos também foi investigada. O extrato obtido das folhas da *C. mollis* inibiu o crescimento de *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Candida krusei* e *Candida tropicalis* enquanto que o extrato obtido das raízes apresentou atividade contra *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans* e *Candida krusei* (de BARROS et al., 2008), concordando assim com dados da literatura sobre a atividade antimicrobiana das plantas pertencentes à família

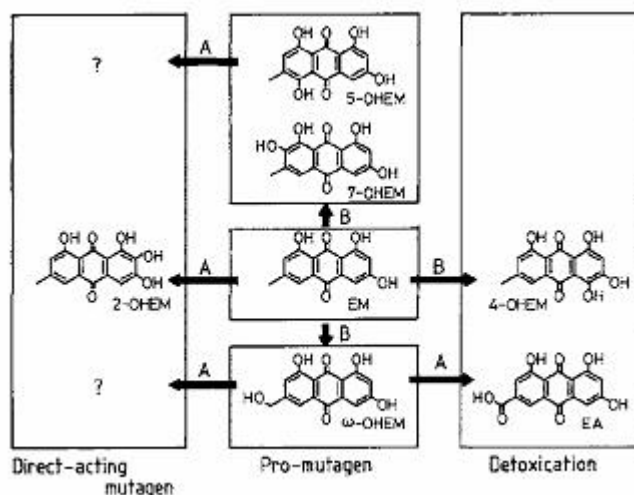
Polygonaceae (COTA et al., 2003; FALKENBERG, 2004; SHAN et al., 2008;).

Algumas espécies desta família apresentam também atividade antiviral. O extrato etanólico de *Polygonum cuspidatum* Siebold & Zucc., apesar da citotoxicidade às células hospedeiras, inibiu eficientemente a proliferação do vírus da hepatite B (CHANG et al., 2005). Já o extrato etanólico de *Rumex bequaertii* De Wild. possui atividade contra o HIV, apresentando a maior taxa de proteção em comparação com os extratos das outras plantas estudadas (COS et al., 2002).

Alguns estudos relatam também a atividade tranqüilizante de extratos derivados de plantas da família Polygonaceae (GOSH et al., 2002), além do efeito protetor da emodina frente a distúrbios cerebrais (GU et al., 2000) e na consolidação da memória (LU et al., 2007).

As antraquinonas são compostos ativos de muitas drogas derivadas de plantas, principalmente as laxativas, e ocorrem principalmente em membros das famílias Liliaceae, Rhamnaceae, Caesalpinioideae, Rubiaceae, Verbenaceae, Asphodelaceae e Polygonaceae (WINKER; SHIMMER, 2000; FALKENBERG, 2004). A exposição humana à emodina, por exemplo, ocorre predominantemente via oral através da ingestão de fitomedicamentos e da alimentação, chegando a ser de 3mg/Kg/dia para uma pessoa de 70 Kg (GO et al., 2007).

*In vivo*, a biotransformação das antraquinonas (1,8 diidroxiantraquinonas) parece ocorrer nas células epiteliais do intestino e nas células hepáticas (MUELLER et al., 1998), sendo a biotransformação da emodina, a 1,8 diidroxiantraquinona mais estudada, mediada pelas enzimas do citocromo P450 (TANAKA et al., 1987; GO et al., 2007). De acordo com Morooka e colaboradores (1990), a biotransformação da emodina gera seis metabólitos principais: 4-hidroxiemodina (4-OHEM); 5-hidroxiemodina (5-OHEM); 7-hidroxiemodina (7-OHEM); 2-hidroxiemodina (2-OHEM);  $\omega$ -hidroxiemodina ( $\omega$ -OHEM) e ácido emódico (EA) (Figura 11). Dentre estes, 4-OHEM, 5-OHEM e 7-OHEM são considerados pró- mutágenos; 2-OHEM um mutágeno de ação direta e,  $\omega$ -OHEM e EA detoxificados (MOROOKA et al., 1990).



**Figura 11** – Estrutura química dos principais metabólitos da emodina.

**Fonte:** Morooka et al., 1990.

Com relação à investigação da atividade genotóxica / mutagênica das antraquinonas, mais especificamente da emodina e fissiona, pouco ainda é descrito na literatura e os resultados parecem ser ainda controversos. Mueller e seus colaboradores atribuem atividade mutagênica à emodina (MUELLER et al., 1998; MUELLER; STOPPER, 1999; MUELLER et al, 1999), outros sugerem que ela seja antimutagênica (SUN et al., 2000; LEE et al., 2005). Estes mesmos estudos mostram ainda que a emodina apresenta maior atividade citotóxica e antimutagênica que a fissiona, esta por sua vez, não genotóxica e citotóxica apenas em altas concentrações (MUELLER et al, 1999).

De acordo com os estudos realizados por Mueller, a mutagenicidade apresentada pela emodina pode ser explicada pela formação de metabólitos mais ativos (2-OHEM) na indução de danos via CYP1A2 e CYP2B e pela inibição da topoisomerase II devido a capacidade da emodina (que possui estrutura planar) de se intercalar ao DNA. Vários estudos conduzidos nas décadas de 1980 e 1990 investigaram o possível efeito mutagênico das antraquinonas e de seus metabólitos em diferentes linhagens de *Salmonella typhimurium* (TIKKANEN et al., 1983; MASUDA; UENO, 1984; MASUDA et al., 1985; MURAKAMI et al., 1987; WESTENDORF et al., 1990; KRIVOBOK et al., 1992). Na maior parte desses estudos, a mutagenicidade foi observada na linhagem TA1537.

No estudo conduzido por SUN et al. (2000), a antimutagenicidade de diversos extratos foi investigada pelo Teste de Ames na linhagem de *Salmonella* TA98. Os extratos derivados de *Rheum officinale* e *Polygonum cuspidatum* (ambas pertencentes à

família Polygonaceae) foram os que apresentaram maior atividade antimutagênica frente ao Trp-P-2 (3-amino-1-methyl-5H-pyrido[4,3-b]indole). Segundo os autores, a antimutagenicidade ocorreu devido à inibição de CYP1A1 pela emodina, promovida pela interação de certa região da sua estrutura com a enzima. A emodina apresentou também atividade antimutagênica nas linhagens de *Salmonella* TA98 e TA100 e *Escherichia coli* PQ37 no trabalho realizado por LEE et al., 2005. Ainda segundo estes pesquisadores, o grupo hidroxila (-OH) presente no carbono 6 (C6) desta antraquinona pode ter importante papel na citotoxicidade verificada. Segundo GO et al. (2007), a razão para os efeitos variados encontrados para a emodina ainda não está clara, não havendo, portanto, consenso sobre a mutagenicidade desta antraquinona nos estudos realizados.

A relação entre a estrutura das antraquinonas e a promoção de uma resposta biológica mais ou menos acentuada, ou mesmo presente ou ausente também já foi observada por outros autores (TIKKANEN et al., 1983; WESTENDORF et al., 1990; KRIVOBOK et al., 1992; SHAN et al., 2008). Por exemplo, de acordo com SHAN et al. (2008), a presença e posição do grupamento hidroxila influencia a eficácia microbiana. TIKKANEN et al. (1983) concluíram que os grupos hidroxilas parecem ser necessários para indução de mutagenicidade das antraquinonas estudadas, uma vez que todas aquelas que apresentaram resposta positiva no Teste de Ames (linhagem TA2637) possuíam de um a três grupos -OH. Pela comparação da atividade estrogênica de antraquinonas isoladas do extrato de *Polygonum cuspidatum*, MATSUDA et al. (2001) concluiu que o grupo 6-OH parece ser essencial para a obtenção de uma resposta mais eficiente. Os autores também demonstraram a capacidade de ligação da emodina aos receptores de estrogênio (Er $\alpha$  e ER $\beta$ ) em células MCF-7.

Outra atividade bastante relatada na literatura sobre a emodina é sua capacidade de indução da apoptose (SHIEH et al., 2004; YANG et al., 2004; WANG et al., 2007; ZONG- YAN et al., 2007). Segundo OLSEN et al. (2007), este talvez seja o principal mecanismo pela qual ela exerce o efeito anti-proliferativo nas diferentes linhagens tumorais humanas. Estudos conduzidos em células de hepatoma humano (Mahlavu, PCL/PRF/5, HepG2; HepG2/C3A, SK-HEP-1) demonstraram que a emodina exerce seu efeito de inibição da proliferação celular através da indução de apoptose (JING et al., 2002; SHIEH et al., 2004). Os resultados obtidos por JING e colaboradores mostraram que a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), o rompimento da permeabilidade da membrana mitocondrial e a ativação de caspases devem estar envolvidos na via apoptótica induzida pela emodina. Já SHIEH e colaboradores concluíram que a indução de apoptose nas células HepG2/C3A foi mediada pela ativação de p53, p21, Fas/APO-1 e caspase-3, sugerindo que tal antraquinona

pode vir a se tornar um agente quimioterapêutico útil no tratamento do carcinoma hepatocelular.

Com relação a fissiona identificada nos extratos da *C. mollis*, pouco ainda é descrito na literatura científica até o momento. Geralmente são estudos fitoquímicos de extratos de plantas medicinais, porém poucos apresentam algum estudo adicional sobre os efeitos biológicos desses dois compostos, principalmente sobre sua possível atividade mutagênica. Em alguns dos estudos descritos acima, a fissiona foi considerada mutagênica em linhagem TA1537 de *Salmonella* após metabolização, não mutagênica nas linhagens TA100, TA98 e TA2638 na ausência e presença de metabolização, citotóxica em células L5178Y quando em altas concentrações e ativa contra danos induzidos por 4-nitroquinolina-1-óxido (NQO) no ensaio SOS cromoteste em *E. coli* (KRIVOBOK et al., 1992; MUELLER et al., 1999; LEE et al., 2005).

Outro grupo de compostos identificados nos extratos da *Coccoloba* são os triterpenos, que pertencem à classe de hidrocarbonetos denominada terpenos ou terpenóides e está presente em inúmeras famílias do reino vegetal. Os terpenóides, geralmente presente como óleos voláteis, constituem uma grande variedade de substâncias vegetais, sendo esse termo empregado para designar as substâncias derivadas de unidades do isopreno (SIMÕES; SPITZER, 2004).

Várias atividades têm sido atribuídas para as diversas classes de terpenos: analgésica (VILLASEÑOR et al., 2004), antifúngica (ABAD et al., 2007), antibactericida (VALENTE et al., 2004), antioxidante (ASSIMOPOULOU et al., 2005), antiinflamatória e anti-hepatotóxica (AHMED et al., 2006), anti-malárico (CUNHA et al., 2003), entre outros. Grande número de estudos tem sido realizado para investigação dos efeitos e mecanismos de ação do ácido ursólico e oleanólico devido aos muitos efeitos atribuídos a estes, mas principalmente devido ao seu potencial anti-tumoral e quimioprotetor (OVESNÁ et al., 2004). A taraxerona, o triterpeno identificado no extrato obtido das folhas de *C. mollis*, geralmente é citada nos trabalhos científicos como resultado do isolamento e identificação fitoquímica de extratos de plantas medicinais. Por exemplo, SETZER et al. (2000) identificaram diversos triterpenos no extrato de *Alchornea latifolia*, dentre eles a taraxerona e uma forma modificada desta molécula (3,4-seco-taraxerona), a qual mostrou-se citotóxica às células HepG2, aparentemente por inibição da topoisomerase II.

## 2 JUSTIFICATIVA

A exposição do homem a agentes mutagênicos tem aumentado consideravelmente desde a revolução industrial, principalmente devido ao aumento de poluentes lançados no meio ambiente, e pela modificação dos hábitos alimentares.

A interação desses agentes aliada à suscetibilidade genética de cada indivíduo apresenta-se como um fator importante na indução de mutações no DNA. Portanto, conhecer os processos mutacionais e os fatores que os induzem possibilita administrar e contribuiu para a diminuição dos riscos dos efeitos indesejados decorrentes das mutações: malformações congênitas, envelhecimento celular e orgânico, câncer, bem como doenças crônico- degenerativas.

Outro aspecto importante da Pesquisa em Produtos Naturais é que esta influencia diretamente a sociedade em muitos domínios. Ainda, contribui com a investigação científica das plantas medicinais tradicionalmente utilizadas pela população e ajuda a levantar informações que, futuramente, poderão contribuir para o registro e validação dos fitoterápicos, garantindo assim maior segurança aos seus usuários. Além disso, os estudos nesta área também são importantes para o desenvolvimento dos fitomedicamentos nacionais, tendo, portanto, um impacto positivo na economia das nações, especialmente naquelas consideradas países em desenvolvimento.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVOS GERAIS

Avaliar a citotoxicidade, mutagenicidade e potencial de indução de apoptose dos extratos etanólicos de folha (EF) e raiz (ER) da planta medicinal *Coccoloba mollis* Casar. (Polygonaceae) em sistemas-teste *in vitro* e *in vivo* utilizando-se os seguintes ensaios: *Salmonella*/microsoma (teste de Ames), ensaio do cometa, teste do micronúcleo, ensaio de citotoxicidade (MTT) e ensaio de detecção de apoptose *in situ*.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar, através do ensaio de citotoxicidade MTT, o efeito citotóxico dos extratos etanólicos de folha e raiz da *Coccoloba mollis* em células HTC e determinar as concentrações dos EF e ER a serem utilizadas nos experimentos de genotoxicidade e mutagenicidade *in vitro*.
- Investigar, *in vitro*, a taxa de revertentes/placa das linhagens TA98 e TA100 de *Salmonella typhimurium* na ausência e presença de metabolização exógena (fração S9) após tratamento realizado com os extratos etanólicos de folha e raiz da *Coccoloba mollis*.
- Investigar, *in vitro*, o potencial de indução da apoptose pelo tratamento das células HTC com os extratos etanólicos de folha e raiz da *Coccoloba mollis* através da análise do padrão de fragmentação do DNA nuclear após coloração com acridina orange.
- Investigar, *in vitro*, a indução de cometas e micronúcleos (ensaio do micronúcleo com bloqueio de citocinese) pelo tratamento das células HTC com os extratos etanólicos de folha e raiz da *Coccoloba mollis*.
- Investigar, *in vivo*, o potencial de indução de cometas e micronúcleos (em células de sangue periférico) do tratamento com os extratos etanólicos de folha e raiz da *Coccoloba mollis*, em camundongos Swiss machos.

**4 ARTIGO 1 – ARTIGO A SER SUBMETIDO AO PERIÓDICO *TOXICOLOGY IN VITRO***

**Avaliação *in vitro* da atividade mutagênica dos extratos de folha e raiz da planta medicinal *Coccoloba mollis* (Polygonaceae).**

M.S. Tsuboy<sup>a</sup>, J.C. Marcarini<sup>a</sup>, D.T. Ferreira<sup>b</sup>; M.S. Mantovani<sup>a,\*</sup>.

<sup>a</sup> *Departamento de Biologia Geral, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brasil.*

<sup>b</sup> *Departamento de Química, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brasil.*

\* Dr. M. S. Mantovani  
Departamento de Biologia Geral – CCB  
Universidade Estadual de Londrina – Campus Universitário  
P.O. Box 6001, Londrina, Paraná, Brazil.  
CEP: 86051-990  
e-mail: [biomsm@uel.br](mailto:biomsm@uel.br)  
Phone: 55 43 3371-4977  
Fax: 55 43 3371-4207

## RESUMO

A *Coccoloba mollis* é uma planta medicinal usada popularmente como fitoterápico em casos de falta de memória, estresse, insônia, anemias, queda de visão e impotência sexual, porém a pesquisa bibliográfica realizada até o momento aponta ausência de estudos científicos sobre os efeitos biológicos da espécie, principalmente os referentes a indução de danos no DNA. O presente trabalho teve por objetivo avaliar, *in vitro* (células hepáticas - HTC), a citotoxicidade, mutagenicidade e indução de apoptose dos extratos etanólicos de folha e raiz da *C. mollis*. Os resultados mostraram que as concentrações do extrato obtido da raiz de *C. mollis* são mais citotóxicas que as obtidas a partir de suas folhas, sendo a redução da viabilidade celular observada no ensaio MTT resultante, pelo menos em parte, da indução de apoptose. Ambos os extratos mostraram-se indutores de danos no DNA na concentração de 20 $\mu$  g/mL no ensaio Cometa, entretanto, não foi detectada mutagenicidade em nenhum dos tratamentos realizados no ensaio do Micronúcleo.

**Keywords:** Herbal extract. *Coccoloba mollis*. HTC. Citotoxicity. Mutagenicity. Apoptosis.

## 1. Introdução

As plantas medicinais constituem uma fonte de matéria bruta para a medicina tradicional e moderna (BANDARANAYAKE, 2006). Atualmente, elas são empregadas mundialmente como remédios caseiros, podem ser vendidas diretamente ao consumidor sem receita médica, e ainda, fornecem compostos para a indústria farmacêutica. Em 1985, Farnsworth et al. mostraram que 25% de todos os medicamentos prescritos aos americanos entre os anos de 1959 e 1980 eram derivados das plantas. No Brasil, as plantas medicinais são amplamente utilizadas na área rural e urbana (RATES, 2001), porém, pouco é conhecido e registrado sobre a cultura popular envolvendo as plantas medicinais (GURIB -FAKIM, 2006).

O interesse da população e comunidade científica em torno dos benefícios trazidos pelos produtos naturais ou por seus componentes ativos tem aumentado nas últimas décadas (CALAPAI; CAPUTI, 2007). Triagens em larga escala com extratos de plantas medicinais já identificaram inúmeros fitocompostos benéficos à saúde humana (MUSARRAT, 2006), porém fatores como a falta de fiscalização e interações com outras drogas pode resultar em efeitos adversos (PHILLIPSON, 2007). Por isso, especial atenção deve ser dada à avaliação da segurança, efetividade e qualidade dos produtos naturais, sendo a avaliação da genotoxicidade/mutagenicidade dos agentes terapêuticos naturais, recomendada por órgãos regulatórios nacionais e internacionais (CNS, RESOLUÇÃO Nº 251/97; OECD, 2001).

A *Coccoloba mollis* Casar. (Polygonaceae) é uma espécie que está sendo receitada como fitoterápico com o nome de “*Erva da memória*”. A espécie, popularmente conhecida como folha-de-bôlo ou falso-novateiro, possui porte arbóreo com 4-12m de altura e ocorre em cerradões e mata semidecídua da bacia do Paraná, na região centro-sul do Brasil (LORENZI, 2002). O insumo desta planta tem sido relatado como benéfico nos casos de falta de memória, estresse, insônia, anemias, queda de visão e impotência sexual. As espécies deste gênero têm sido utilizadas pela população brasileira como adstringente, no tratamento da febre, diarreia, gonorréia, hemorróidas, problemas menstruais e hemorragias uterinas (MORS et al., 2000; COTA et al., 2003), porém ainda são pouco estudadas, não existindo literatura científica até o presente momento sobre os efeitos biológicos que estas espécies possam ter em sistemas *in vitro* e *in vivo*. Em vista disso, o presente trabalho tem por objetivo avaliar a citotoxicidade, mutagenicidade e indução de apoptose dos extratos etanólicos de folha e raiz da *Coccoloba mollis* em sistema-teste *in vitro* (células HTC), visando contribuir com a investigação científica das plantas medicinais tradicionalmente utilizadas pela população.

## 2. Materiais e Métodos

### 2.1. Extratos da *Coccoloba Mollis*

Para o preparo dos extratos, as folhas e raízes da *C. mollis* foram submetidas à extração exaustiva com etanol e as soluções obtidas foram concentradas em evaporador rotatório produzindo os respectivos extratos.

Para o uso em cultura, cada um dos extratos brutos foi dissolvido em DMSO (Dimetilsulfóxido) e PBS (Phosphate Buffer Saline) ou meio de cultura DMEM/F12 (Gibco) sem soro (no ensaio MTT), sendo que a concentração de DMSO não ultrapassou 10% do volume total da solução mãe a ser preparada. Após, os mesmos foram filtrados e esterilizados utilizando-se uma unidade filtrante descartável de 22 µm de porosidade (Millex® - Millipore).

As concentrações dos extratos de folha (EF) e raiz (ER) testadas no Ensaio do MTT foram as seguintes: 0,2 µg/mL; 2 µg/mL; 20 µg/mL; 200 µg/mL; 2000 µg/mL de meio de cultura.

Para avaliação da genotoxicidade (ensaio Cometa) e mutagenicidade (ensaio do micronúcleo) foram utilizadas três concentrações definidas pelo MTT.

### 2.2. Agentes indutores de dano no DNA

Os agentes indutores de dano no DNA empregados para controle positivo dos experimentos foram os seguintes: benzo[a]pireno (CAS 50-32-8; Fluka) e cisplatina (CAS 15663-27-1; Sigma Aldrich). Para a indução de danos nos ensaios do Cometa e Micronúcleo foi utilizado benzo[a]pireno em concentração final de 25 µg/mL de meio de cultura, por 24 h e 26 h respectivamente. No teste de avaliação da indução de apoptose, a cisplatina foi utilizada em concentração final de 20 µM por 24 horas.

### 2.3. *Linhagem celular*

As células HTC (proficientes em metabolização) foram adquiridas no Banco de Células do Rio de Janeiro (UFRJ), Brasil. Estas foram cultivadas em estufa BOD a 37°C em frascos de cultura de 25 cm<sup>2</sup> contendo 5 mL de meio DMEM/F12 (Gibco) suplementado com 10% de soro bovino fetal (Gibco) e antibiótico/antimicótico. Para conduzir os testes de genotoxicidade e mutagenicidade, foram semeadas aproximadamente 10<sup>6</sup> células por frasco de cultura experimental. Nos experimentos para avaliação da indução de apoptose, as células (aproximadamente 2,5 x 10<sup>5</sup>) foram cultivadas em lamínula de 20 x 20 mm de tamanho em tubos de cultura de 10 cm<sup>2</sup> de superfície contendo 3 mL de meio de cultura.

### 2.4. *Ensaio de citotoxicidade MTT*

O ensaio de citotoxicidade foi realizado de acordo com o protocolo descrito por MOSMANN (1983) com algumas modificações. Em cada um dos poços da placa de cultivo celular foram semeadas aproximadamente 2,5 x 10<sup>4</sup> células HTC. Estas foram expostas ao tratamento com os extratos por 24, 48 e 72 horas. Ao final deste período, as células foram incubadas com MTT (CAS 298-93-1; Sigma Aldrich; 0,005g de MTT; 5 mL de PBS; 10 mL de meio de cultura sem soro) por 4h. A leitura foi realizada em espectrofotômetro de leitor de placas (Uniscience) a 550 nm.

### 2.5. *Ensaio do Cometa (SCGE)*

O teste do Cometa foi realizado de acordo com as premissas de Tice et al., 2000. Brevemente, após 24 horas de tratamento das células HTC com o agente indutor de danos ou com EF e ER (concentrações citadas no item 2.1), as células foram tripsinizadas (500 µL de tripsina-EDTA 0,025%; 37°C), a suspensão celular centrifugada (5 minutos, 1000 rpm) e ressuspendida em 500 µL de meio de cultura. Em seguida, esta recebeu 120 µL de agarose baixo ponto de fusão (LMP – 0,5%), sendo este material depositado em lâminas pré-

gelatinizadas (agarose de ponto de fusão normal; 1,5%) e levadas para solução de lise por pelo menos 1h. Após desnaturação (20 minutos) e eletroforese alcalinas (25 V, 300 mA, 20 minutos), as lâminas foram neutralizadas, fixadas e mantidas sob refrigeração até o momento da análise. A coloração das lâminas foi feita com de brometo de etídeo e a análise foi feita visualmente (KOBAYASHI, 1995) em microscopia de fluorescência (filtro de excitação de 420-490 nm e filtro de barreira de 520 nm) e aumento de 400x. Os cometas foram classificados em: *classe 0* – nucleóides que não apresentam cauda; *classe 1* – nucleóides com cauda menor que o diâmetro do nucleóide; *classe 2* – nucleóides com cauda de tamanho entre 1 a 2 vezes o diâmetro do nucleóide; *classe 3* – nucleóides com cauda 2 vezes maior que o diâmetro do nucleóide. Os experimentos foram feitos em triplicata, sendo analisadas 300 células por tratamento. A análise da viabilidade celular foi realizada pelo método de exclusão por azul de trypan, sendo considerados somente os tratamentos com índice superior a 80%.

#### 2.6. *Teste do Micronúcleo com bloqueio de citocinese (MNCtB)*

A avaliação da mutagenicidade dos EF e ER da *Coccoloba mollis* ocorreu após 26h de exposição das células aos extratos e à citocalasina-B (3 µg/mL). A colheita das células foi feita de acordo com o protocolo de OLIVEIRA (2002). Resumidamente, as células foram tripsinizadas (500 µL de tripsina-EDTA 0,025%; 37°C), centrifugadas (5 minutos, 1000 rpm), hipotonizadas (citrato de sódio 1%) e fixadas (3metanol: 1ácido acético). Os experimentos foram feitos em triplicata e três mil células binucleadas foram analisadas por tratamento. Os critérios de seleção das células binucleadas, de identificação do micronúcleo e o cálculo do índice de divisão nuclear (IDN) seguiu o descrito por FENECH, 2000.

#### 2.7. *Teste para avaliação da indução de apoptose in situ*

A identificação das células apoptóticas foi feita por análise do padrão de fragmentação do DNA nuclear após coloração com acridina orange. Neste ensaio, o tratamento das células foi realizado posteriormente a sua estabilização em cultura (24h), com as concentrações de EF e ER previamente testadas no SCGE e no MNCtB, além da

concentração de 200  $\mu\text{g/mL}$ . Após as 24h de tratamento, a colheita foi feita de acordo com o descrito por ROVOZZO, 1973. Brevemente, após lavagem com PBS, a lamínula é retirada do tubo de cultura e fixada em fixador de Carnoy por 5 minutos. A lamínula é então mergulhada rapidamente em cada uma das placas contendo concentrações decrescentes de etanol (95% a 25%), seguida de lavagem com Tampão McIlvaine por 5 minutos, coloração com acridina orange (0,01%, 5 minutos) e nova lavagem com o tampão. Os experimentos foram feitos em triplicata e 1500 células foram analisadas por tratamento.

## 2.8. *Análise Estatística*

Os dados obtidos no teste de citotoxicidade MTT foram submetidos à análise de variância (ANOVA) seguida de Teste de Tukey. Para análise dos dados obtidos no SCGE, no MNcTB, na análise do IDN e no teste de avaliação da indução de apoptose foi utilizado o Teste-t de Student em comparação feita com o controle negativo. Em todos os testes foi considerado  $\alpha = 0,05$ . As análises foram realizadas com auxílio do programa GrafPad InStat® versão 3.02.

### 3. Resultados

#### 3.1. Ensaio de citotoxicidade MTT

As Figuras 1 e 2 mostram os resultados obtidos no teste MTT. A análise dos dados revelou que somente concentrações a partir de 2000 µg/mL do EF são citotóxicas às células HTC. Para o ER, concentrações a partir de 200 µg/mL já se apresentaram citotóxicas.

#### 3.2. Ensaio do Cometa (SCGE)

Podemos observar na Figura 3 que, além do tratamento com benzo[a]pireno, somente a exposição das células à EF e ER na maior concentração testada (20 µg/mL) foi capaz de aumentar a indução de cometas de maneira estatisticamente significativa. Pode-se notar ainda, pelos valores do escore médio, que o tratamento com os extratos, induziu a formação de cometas pertencentes somente à classe 1, enquanto que no controle positivo, os cometas resultantes se distribuíram entre as classes 1 e 2 (dados não apresentados). A viabilidade celular permaneceu em torno de 90% em todos os tratamentos (Figura 3).

#### 3.3. Teste do Micronúcleo com bloqueio de citocinese (MNCtB)

Os resultados obtidos no MNCtB revelaram que não houve aumento estatisticamente significativo no número de células binucleadas micronucleadas ou tratamentos com índice de divisão nuclear (IDN) estatisticamente diferente frente à exposição das células com os EF e ER. Houve somente uma diferença estatisticamente significativa no número de células binucleadas com micronúcleo nas culturas tratadas com a menor concentração (0,2 µg/mL) de ambos os extratos (Figura 4).

### *3.4. Teste para avaliação da indução de apoptose in situ*

Podemos observar na Figura 5 que à medida que as concentrações de ambos os extratos aumentam mais células entram em apoptose ( $r = 0,966$  para ER e  $r = 0,885$  para EF), sendo o resultado obtido na maior concentração EF e ER empregada ( $200 \mu\text{g/mL}$ ) estatisticamente significativo em relação ao controle negativo.

#### 4. Discussão

O ensaio MTT é um dos mais empregados e mais sensíveis testes para a detecção de citotoxicidade *in vitro* (FOTAKIS; TIMBRELL, 2006). Testes como este, apresentam vantagens como sua rapidez e precisão (MOSMANN, 1983). Dentre os testes mais empregados e amplamente aceitos para investigação de substâncias que causam dano genético estão o ensaio do cometa (WITTE et al., 2007; BURLINSON et al., 2007); e o teste do micronúcleo (FENECH, 1999; KRISHNA; HAYASHI, 2000). Segundo Wasson et al. (2008), o ensaio do Cometa, além de ser um teste simples, barato e rápido para a avaliação de danos e reparo do DNA, consiste em um biomarcador ideal para o estudo dos efeitos da nutrição sobre o câncer, e vem sendo extensivamente empregado em estudos de avaliação de compostos naturais. A agência norte-americana *Food and Drug Administration* recomenda que seja feito um teste citogenético em células de mamíferos, entre outros, para a compreensão da genotoxicidade / mutagenicidade de seu objeto de estudo (FDA, 1997). Portanto, o MNCtB aqui realizado, em células de hepatoma de *Rattus norvegicus*, atende essa exigência. Além disso, linhagens celulares hepáticas, tais como HTC, HepG2 e culturas primárias de hepatócitos são importantes ferramentas em estudos de genotoxicidade e mutagenicidade, uma vez que o fígado é o principal sítio de metabolização de xenobióticos (MERSH-SUNDERMANN et al., 2004).

Os resultados obtidos com os testes de genotoxicidade e mutagenicidade dos extratos etanólicos de folha e raiz da *Coccoloba mollis*, nas condições experimentais descritas anteriormente, apontam genotoxicidade apenas na maior concentração testada e ausência de mutagenicidade. Pela análise do IDN, podemos dizer que esta ausência de mutagenicidade ou a redução das células binucleadas micronucleadas encontrada em EF1 e ER1 em relação ao controle, não pode explicada pelo atraso da divisão celular, uma vez que o IDN foi semelhante em todos os tratamentos (Figura 4) e a formação do micronúcleo é dependente do ciclo celular (FENECH 2006; MATEUCA et al., 2006). Segundo ZEIGER (2007) a resposta obtida em EF1 e ER1 poderia ser considerada como antimutagênica, uma vez que os danos observados neste tratamento foram menores que a frequência de danos basais (ou seja, aquela observada no controle) e que este não apresentou evidências de citotoxicidade. Com relação a EF3 e ER3, observamos que estes tratamentos foram genotóxicos, porém não mutagênicos. O aumento não significativo na frequência de micronúcleos nesta concentração pode ser em parte devido à ação do sistema de reparo de danos no DNA, uma vez que os danos induzidos

foram pequenos (somente cometas de classe 1), provavelmente desaparecendo durante o ciclo celular e impedindo sua visualização na forma de micronúcleo.

Em recente estudo, ainda não finalizado, sobre os constituintes químicos presentes nos extratos etanólicos de folha e raiz da *Coccoloba mollis* aqui testados, duas antraquinonas foram isoladas do ER (emodina e fissiona), enquanto que hidrocarbonetos, ésteres de cadeia longa e o triterpeno 3-taraxerona foram caracterizados no EF (de BARROS et al., 2007).

As antraquinonas são compostos ativos de muitas drogas derivadas de plantas, principalmente as laxativas, e ocorrem em membros de diversas famílias do reino vegetal, inclusive na família Polygonaceae (WINKER; SHIMMER, 2000). A emodina é o principal composto ativo presente em várias espécies medicinais e exibe atividades biológicas tais como antiinflamatória, antibiótica, antiviral, imunossupressora, hepatoprotetora (COS et al., 2002; JING et al., 2002), além de inibir a proliferação de uma grande variedade de linhagens celulares tumorais (KUO et al., 1997; OLSEN et al., 2007). Alguns estudos relatam também a atividade tranqüilizante de extratos derivados de plantas da família Polygonaceae (GOSH et al., 2002), além do efeito protetor da emodina frente a distúrbios cerebrais (GU et al., 2000) e na consolidação da memória (LU et al., 2007), fundamentando assim o uso da *Coccoloba mollis* como modulador da memória e tranqüilizante.

Quanto à investigação da atividade genotóxica / mutagênica das antraquinonas, mais especificamente da emodina e fissiona, pouco ainda é descrito na literatura. Mueller e seus colaboradores atribuem atividade genotóxica à emodina (MUELLER et al., 1998; MUELLER; STOPPER, 1999; MUELLER et al, 1999), outros sugerem que ela seja antimutagênica (SUN et al., 2000; LEE et al., 2005). Segundo Go et al. (2007), a razão para os efeitos variados encontrados para a emodina ainda não está clara, não havendo, portanto, consenso sobre a mutagenicidade desta antraquinona nos estudos realizados.

De acordo com os estudos realizados por Mueller e colaboradores (MUELLER et al., 1998; MUELLER; STOPPER, 1999; MUELLER et al, 1999), a mutagenicidade apresentada pela emodina pode ser explicada pela formação de metabólitos mais ativos (2-hidroxiemodina) na indução de danos via CYP1A2 e CYP2B ou pela inibição da topoisomerase II devido a capacidade da emodina (que possui estrutura planar) de se intercalar ao DNA. A antimutagenicidade frente ao Trp-P-2 observada por Sun et al. (2000) seria devido à inibição de CYP1A1 pela emodina, promovida pela interação de certa região da sua estrutura com a enzima, impedindo assim a N-hidroxilação do agente indutor de danos. A emodina apresentou também atividade antimutagênica nas linhagens de *Salmonella* TA98 e TA100 e *Escherichia coli* PQ37 no trabalho realizado por Lee et al., 2005. Ainda segundo

estes pesquisadores, o grupo hidroxila (-OH) presente no carbono 6 (C6) desta antraquinona pode ter importante papel na citotoxicidade verificada nas diferentes linhagens tumorais que foram utilizadas no estudo. Estes mesmos estudos mostram ainda que a emodina apresenta maior atividade citotóxica e antimutagênica que a fissiona, esta por sua vez, não genotóxica e citotóxica apenas em altas concentrações (MUELLER et al, 1999).

A fissiona, outra antraquinona identificada em ER, foi considerada mutagênica em linhagem TA1537 de *Salmonella* após metabolização, não mutagênica nas linhagens TA100, TA98 e TA2638 na ausência e presença de metabolização, citotóxica em células L5178Y quando em altas concentrações e ativa contra danos induzidos por 4-nitroquinolina-1-óxido (NQO) no ensaio SOS cromoteste em *E. coli* (KRIVOBOK et al., 1992; MUELLER et al, 1999; LEE et al., 2005).

Outra atividade bastante relatada na literatura sobre a emodina é sua capacidade de indução da apoptose (SHIEH *et al.*, 2004; YANG *et al.*, 2004; WANG *et al.*, 2007; ZONG- YAN *et al.*, 2007). Segundo Olsen et al. (2007), este talvez seja o principal mecanismo pela qual ela exerce o efeito anti-proliferativo nas células tumorais.

Os resultados experimentais obtidos em nosso estudo demonstram que o ER apresenta maior toxicidade que o EF, provavelmente devido à presença da emodina. Os dados obtidos no teste para detecção da apoptose indicam que a redução das células viáveis encontrada no ensaio MTT, é em parte resultante da indução da apoptose nas células HTC, uma vez que EF4 e ER4 apresentaram maior número de células apoptóticas. Os resultados de ER3 no MNCtB e no teste de indução de apoptose *in situ*, apesar de não significativos estatisticamente, podem sugerir também que pode estar havendo uma maior indução de apoptose do que a detectada pelo teste *in situ*, uma vez que a fragmentação do DNA nuclear é um evento tardio do processo de apoptose (ELMORE, 2007), porém sem comprometimento da formação de micronúcleos (IDN não significativo).

Com relação aos experimentos com o EF é difícil afirmarmos ou mesmo sugerir a razão destes resultados, uma vez que pouco se sabe sobre sua composição. Talvez o triterpeno identificado possa contribuir para a citotoxicidade encontrada, pois sabe-se que outros triterpenos (ácido ursólico e oleanólico) possuem efeito anti-tumoral (OVESNÁ et al., 2004) e que uma forma modificada da 3-taraxerona (3,4-seco-taraxerona), apresentou atividade citotóxica às células HepG2 (SETZER *et al.*, 2000).

Nosso estudo é o primeiro a investigar a possível mutagenicidade dos extratos da *Coccoloba mollis*. Tais resultados podem contribuir para o registro e validação deste fitoterápico, proporcionando assim, uma maior segurança para os usuários desta planta

medicinal.

## Referências

- Bandaranayake, W.M. 2006. Quality control, screening, toxicity and regulation of herbal drugs. In: Ahmad, I., Aqil, F., Owais, M. (Eds.). Modern Phytomedicine: turning medicinal plants into drugs. 1st edition., Wiley-vch Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, pp. 25-58.
- Burlinson, B., Tice, R.R., Speit, G., Agurell, E., Brendler-Schwaab, S.Y., Collins, A.R., Escobar, P., Honma, M., Kumaravel, T.S., Nakajima, M., Sasaki, Y.F., Thybaud, V., Uno, Y., Vasques, M., Hartmann, A. 2007. Fourth International Workshop on Genotoxicity testing: Results of the in vivo Comet assay workgroup. Mutation Research 627, 31-35.
- Calapai, G., Caputi, A.P. 2007. Herbal medicines: Can we do without pharmacologist? eCAM 4, 41-43.
- CNS – CONSELHO NACIONAL DE SAÚDE. 1997. Resolução nº 251, 07/08/1997. <http://conselho.saude.gov.br/docs/Resolucoes/Reso251.doc>
- Cos, P., Hermans, N., De Bruyne, T., Apers, S., Sindambiwe, J.B., Witvrouw, M., De Clercq, E., Vanden-Berghe, D., Pieters, L., Vlietinck, A.J. 2002. Antiviral activity of Rwandan medicinal plants against human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1). Phytomedicine 9, 62-68.
- Cota, B.B., Oliveira, A.B., Souza-Filho, J.D., Braga, F.C. 2003. Antimicrobial activity and constituents of *Coccoloba acrostichoides*. Fitoterapia 74, 729-731.
- De Barros, I., Fidelis, Q.C., Santos, G.F., Pinto, J.P., Faccione, M., Tsuboy, M.S.F., Mantovani, M.S., Braz-Filho, R., Ferreira, D.T. 2007. Phytochemistry of root and leaf of *Coccoloba mollis*. In: First brazilian conference on natural products, São Pedro, São Paulo, Brasil.
- Elmore, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. 2007. Toxicologic Pathology 35(4), 495-516.
- Farnsworth, N., Akerele, A.O., Bingel, A.S., Soejarto, D.D., Guo, Z. 1985. Bulletin WHO 63, 965–981.
- FDA – FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. 1997. Guidance for industry S2B Genotoxicity: A standard battery for genotoxicity testing of pharmaceuticals. <http://www.fda.gov/CDER/GUIDANCE/1856fnl.pdf>
- Fenech, M., Holland, N., Chang, W.P., Zeiger, E., Bonassi, S. 1999. The Human Micronucleus Project – An international collaborative study on the use of the micronucleus

- technique for measuring DNA damage in humans. *Mutation Research* 428, 271-283.
- Fenech, M. 2006. Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a “cytome” assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death. *Mutation Research* 600, 58-66.
- Fenech, M. 2000. The in vitro micronucleus technique. *Mutation Research* 455, 81-95.
- Fotakis, G., Timbrell, J.A. 2006. In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicology Letters* 160, 171-177.
- Go, S.Y., Kwon, K.J., Park, S.N., Sheen, Y.Y. 2007. Genetic toxicity test of emodin by Ames, Micronucleus, Comet assays and microarray analysis showing differential result. *The Journal of Applied Pharmacology* 15, 192-198.
- Gosh, L., Arunachalam, G., Murugesan, T., Pal, M., Saba, B.P. 2002. Studies on the psychopharmacological activities of *Rumex nepalensis* Spreng root extract in rats and mice. *Phytomedicine* 9, 202-206.
- Gu, J., Zhang, X., Fei, Z., Wen, A., Qin, S., Yi, S., Chen, Y., Li, X. 2000. Rhubarb extracts in treating complications of severe cerebral injury. *Chinese Medical Journal* 113, 529-531.
- Gurib-Fakim, A. 2006. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine* 27, 1-93.
- Jing, X., Ueki, N., Cheng, J., Imanishi, H., Hada, T. 2002. Induction of apoptosis in hepatocellular carcinoma cell lines by emodin. *Japanese Journal of Cancer Research* 93, 874-882.
- Kobayashi, H., Sugiyama, C., Morikawa, Y., Hayashi, M., Sofuni, T. 1995. A comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the single cell gel electrophoresis assay. *MMS Communications* 3, 103-115.
- Krishna, G., Hayashi, M. 2000. In vivo rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. *Mutation Research* 455, 155-166.
- Krivobok, S., Seigle-Murandi, F., Steiman, R., Marzin, D.R., Betina, V. 1992. Mutagenicity of substituted anthraquinones in the Ames/Salmonella microsomes system. *Mutation Research* 279 (1), 1-8.
- Kuo, Y., Sun, C., Ou, J., Tsai, W. 1997. A tumor cell growth inhibitor from *Polygonum hypoleucum* OHWI. *Life Sciences* 61, 2335-2344.
- Lee, N., Choi, J., Koo, B., Ryu, S., Han, Y., Lee, S., Lee, D. 2005. Antimutagenicity and cytotoxicity of the constituents from the aerial parts of *Rumex acetosa*. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 28, 2158-2161.

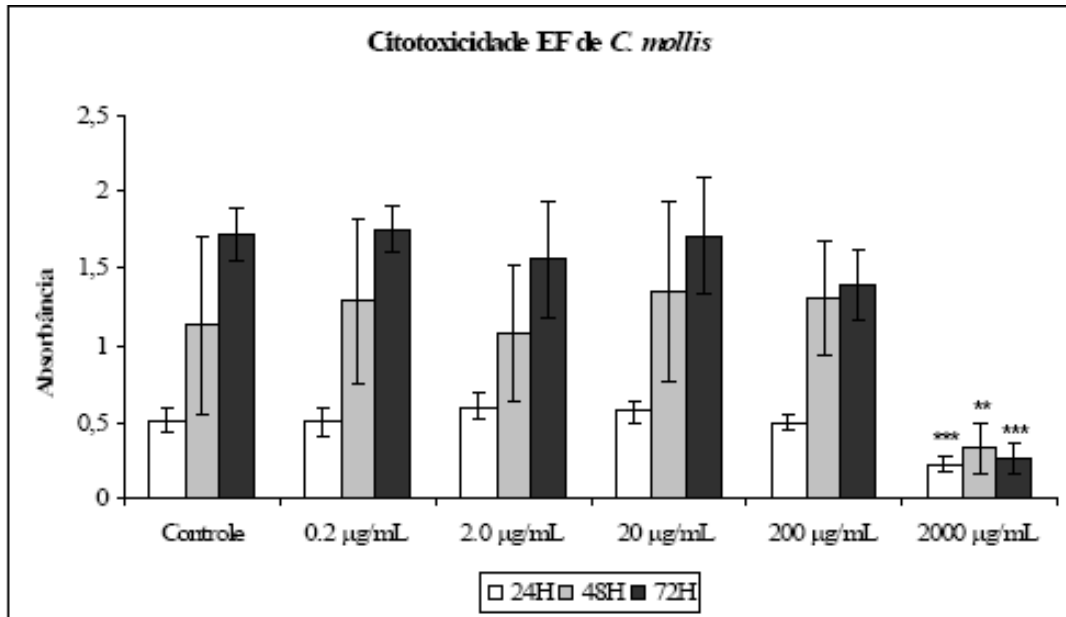
- LORENZI H. 2002. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil, vol. 2. Nova Odessa, Instituto Plantaum.
- Lu, M., Hsieh, M., Wu, C., Cheng, H., Hsieh, C., Lin, Y., Peng, W. 2007. Ameliorating effect of emodin, a constitute of *Polygonatum multiflorum*, on cyclohexamide-induced impairment of memory consolidation in rats. *Journal of Ethnopharmacology* 112, 552-556.
- Mateuca, R., Lombaert, N., Aka, P.V., Decordier, I., Kirsch-Volders, M. 2006. Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring. *Biochimie* 88, 1515-1531.
- Mersh-Sundermann, V., Knasmüller, S., Wu, X., Darroudi, F., Kassie, F. 2004. Use of human-derived liver cell line for the detection of cytoprotective, antigenotoxic and cogenotoxic agents. *Toxicology* 198, 329-340.
- MORS, W. B., RIZZINI, C. T., PEREIRA, N. A. 2000. Medicinal plants of Brazil. DeFilipps, R. A (Ed.), 1st ed. Reference Publications.
- Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation cytotoxic assays. *Journal of Immunological Methods* 65, 55-63.
- Mueller, S.O., Stopper, H. 1999. Chracterization of the genotoxicity of anthraquinones in mammalian cells. *Biochimca et Biophysica Acta* 1428, 406-414.
- Mueller, S.O., Schmitt, M., Dekant, W., Stopper, H., Schlatter, J., Schreirer, P., Lutz, W.K. 1999. Occurrence of emodin, chrysophanol and physcion in vegetables, herbs and liquors. Genotoxicity and Anti-genotoxicity of the anthraquinones and of the whole plants. *Food and Chemical Toxicology* 37, 481-491.
- Mueller, S.O., Stopper, H., Dekant, W. 1998. Biotransformation of the anthraquinones emodin and chrysophanol by cytochrome P450 enzymes. Bioactivation to genotoxic metabolites. *Drug Metabolism and Disposition* 26, 540-546.
- Musarrat, J., Aqil, F., Ahmad, I. 2006. Mutagenicity and Antimutagenicity of Medicinal Plants. In: Ahmad, I., Aqil, F., Owais, M. (Eds.). *Modern Phytomedicine: turning medicinal plants into drugs*. 1st edition., Wiley-vch Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, p. 271-292.
- OECD – ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. 2001. Harmonized integrated classification system for human health and environmental hazards of chemical substances and mixtures. <http://www.oecd.org/dataoecd/48/51/37182285.pdf>
- Oliveira, J.M., Jordão, B.Q., Ribeiro, L.R., Da Eira, A.F., Mantovani, M.S. 2002. Anti-genotoxic effect of aqueous extracts of sun mushroom (*Agaricus blazei* Murril lineage 99/26) in mammalian cells in vitro. *Food and Chemical Toxicology* 40, 1775-1780.

- Olsen, B.B., Bjorling-Poulsen, M., Guerra, B. 2007. Emodin negatively affects the phosphoinositide 3-kinase/AKT signalling pathway : A study on its mechanisms of action. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 39, 227-237.
- Ovesná, Z., Vachálková, A., Horváthová, K., Tóthová, D. 2004. Pentacyclic triterpenoic acids: new chemoprotective compounds: Minireview. *Neoplasma* 51(5), 327-333.
- Phillipson, J.D. 2007. Phytochemistry and pharmacognosy. *Phytochemistry* 68, 2960–2972.
- Rates, S.M.K. 2001. Plants as source of drugs. *Toxicon* 39, 603-613.
- ROVOZZO, G. C., BURKE, C. N. 1973. A manual of basic virological techniques. New Jersey: Prentice Hall, 159p.
- Setzer, W.N., Shen, X., Bates, R.B., Burns, J.R., McClure, K.J., Zhang, P., Moriarity, D.M., Lawton, R.O. 2000. A phytochemical investigation of *Alchornea latifolia*. *Fitoterapia* 71, 195-198.
- Shieh, D., Chen, Y., Yen, M., Chiang, L., Lin, C. 2004. Emodin-induced apoptosis through p53-dependent pathway in human hepatoma cells. *Life Sciences* 74, 2279-2290.
- Sun, M., Sakakibara, H., Ashida, H., Danno, G., Kanazawa, K. 2000. Cytochrome P4501A1-inhibitory action of antimutagenic anthraquinones in medicinal plants and the structure-activity relationship. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 64, 1373-1378.
- Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J. C., Sasaki, Y.F. 2000. Single Cell Gel/Comet assay: Guideline for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 35, 206-221.
- Wang, C., Wu, X., Chen, M., Duan, W., Sun, L., Yan, M., Zhang, L. 2007. Emodin induces apoptosis through caspase 3-dependent pathway in HK-2 cells. *Toxicology* 231, 120-128.
- Wasson, G.R., Mckelvey-Martin, V.J., Downes, C.S. 2008. The use of comet assay in the study of human nutrition and cancer. *Mutagenesis* 23(3), 153-162.
- WINKER, M., SHIMMER, O. 2000. Modes of action of defensive secondary metabolites. In: WINK M. Functions of plant secondary metabolites and their exploitation in biotechnology. 1st edition. England: Sheffield Academic Press, p. 17-133.
- Witte, I., Plappert, U., Wall, H., Hartmann, A. 2007. Genetic Toxicity Assessment: Employing the best science for human evaluation Part III: The Comet Assay as an alternative to *in vitro* clastogenicity tests for early drug candidate selection. *Toxicological Sciences* 97(1), 21-26.

Yang, J., Li, H., Chen, Y., Wang, X., Shi, G., Hu, Q., Kang, X., Lu, Y., Tang, X., Guo, Q., Yi, J. 2004. Anthraquinones sensitize tumor cells to arsenic cytotoxicity in vitro and in vivo via reactive oxygen species-mediated dual regulation of apoptosis. *Free Radical Biology & Medicine* 37, 2027-2041.

Zeiger, E. 2007. What is needed for an acceptable antimutagenicity manuscript? *Mutation Research* 626, 1-3.

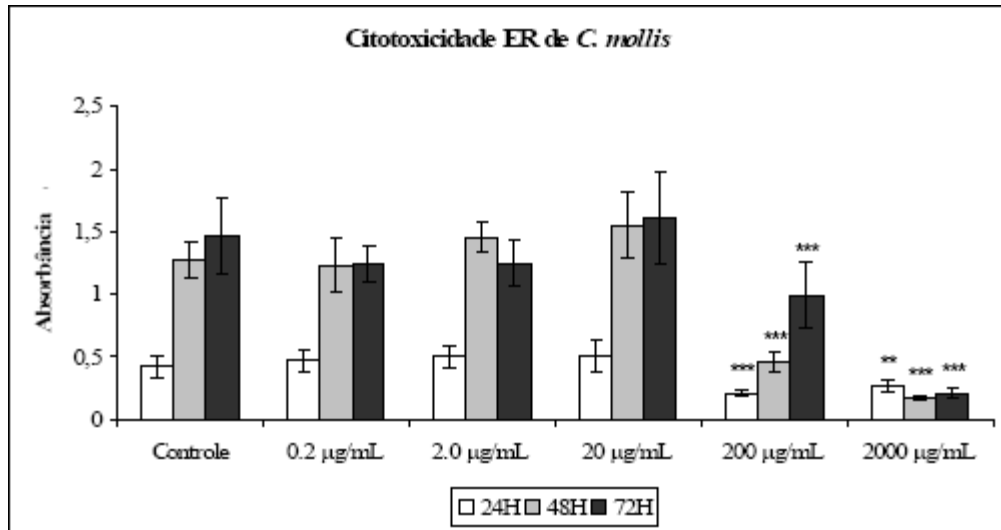
Zong-Yan, F., Jin-Xiang, H., Hai-Yan, H. 2007. Effects of emodin on gene expression profile in small cell lung cancer NCI-H446. *Chinese Medical Journal* 120, 1710-1715.



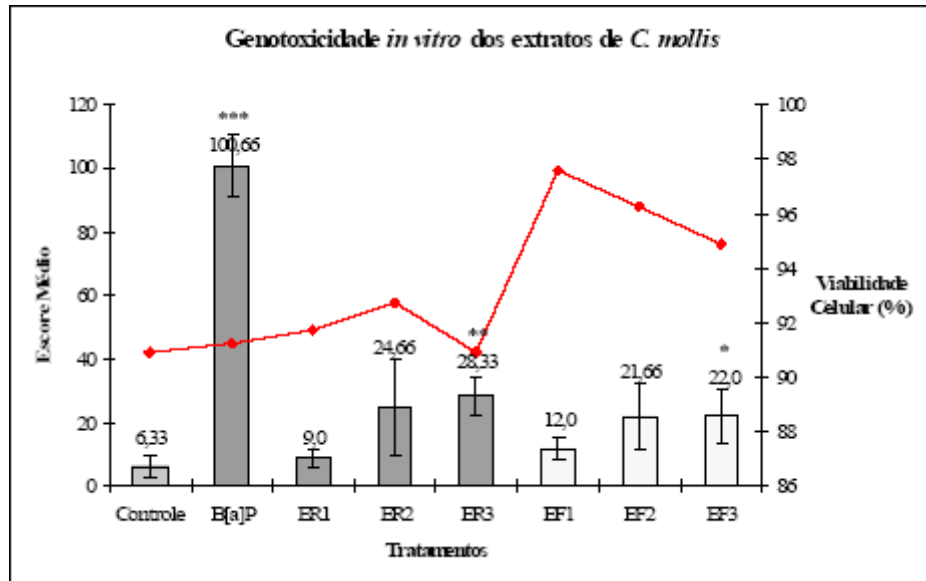
**Figura 1** – Absorbância média observada no Ensaio MTT após tratamento de 24, 48 e 72 horas com o extrato etanólico da folha (EF) de *C. mollis*.

\*\* Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle negativo ( $p < 0,01$ ).

\*\*\* Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle negativo ( $p < 0,001$ ).

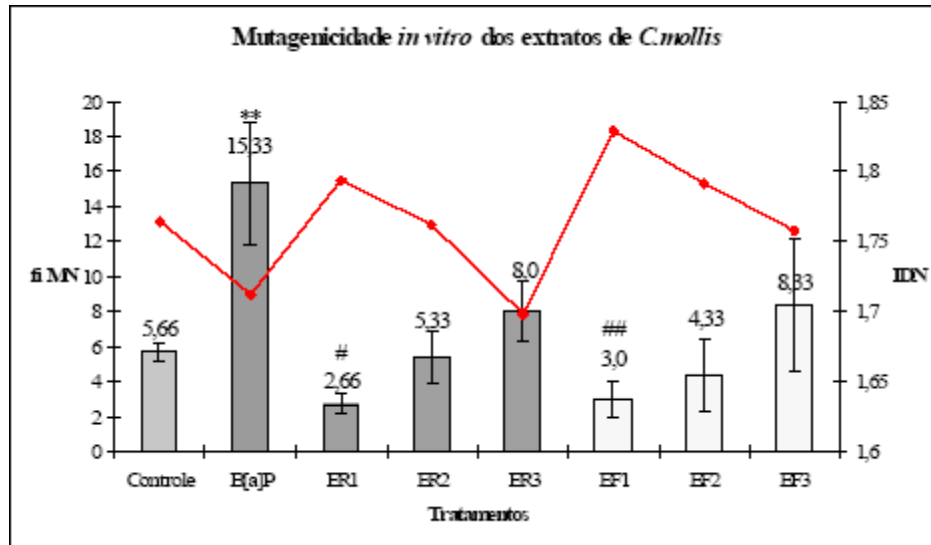


**Figura 2** – Absorbância média observada no Ensaio MTT após tratamento de 24, 48 e 72 horas com o extrato etanólico da raiz (ER) de *C. mollis*.  
 \*\* Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle negativo ( $p < 0,01$ ).  
 \*\*\* Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle negativo ( $p < 0,001$ ).

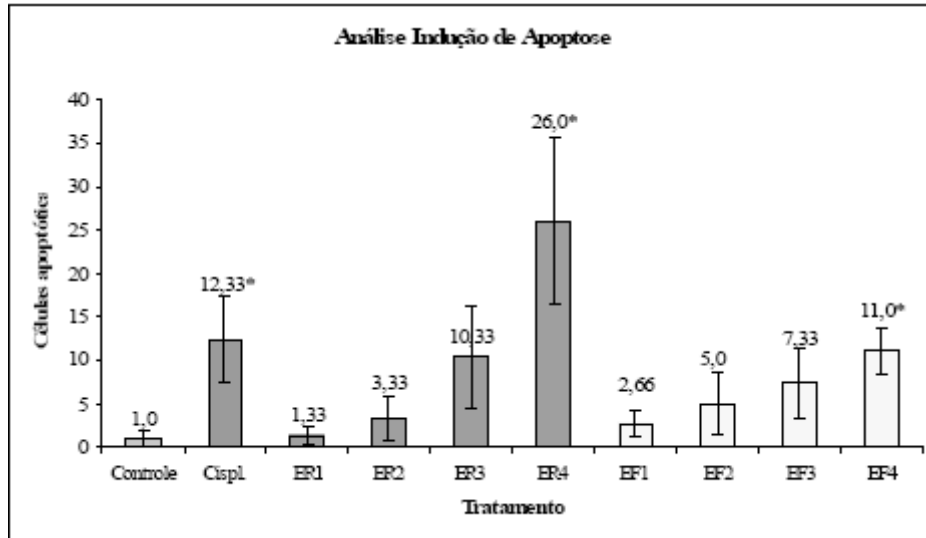


**Figura 03** – Escore médio de cometas observado em células HTC (barras) e viabilidade celular (%) (linha) encontrada após tratamento de 24 horas com os extratos de *C. mollis*. **B[a]P**: Benzo[a]pireno – 25 µg/mL; **ER1**: 0,2 µg/mL; **ER2**: 2,0 µg/mL; **ER3**: 20 µg/mL; **EF1**: 0,2 µg/mL; **EF2**: 2,0 µg/mL; **EF3**: 20 µg/mL **ER** = Extrato etanólico da raiz da *C. mollis*; **EF** = Extrato etanólico da folha da *C. mollis*. Média de três culturas; 100 células avaliadas em cada cultura para análise dos cometas.

\*p = 0,0382 ; \*\*p = 0,0057 ; \*\*\*p = 0,0001.



**Figura 04** – Frequência média de células binucleadas com micronúcleo (barras) e Índice de Divisão Nuclear (IDN) (linha) encontrado após tratamento de 26 horas com os extratos de *C. mollis*. **B[a]P**: Benzo[a]pireno – 25 µg/mL; **ER1**: 0,2 µg/mL; **ER2**: 2,0 µg/mL; **ER3**: 20 µg/mL; **EF1**: 0,2 µg/mL; **EF2**: 2,0 µg/mL; **EF3**: 20 µg/mL **ER** = Extrato etanólico da raiz da *C. mollis*; **EF** = Extrato etanólico da folha da *C. mollis*. Média de três culturas; 1000 células binucleadas contabilizadas em cada cultura para análise da frequência de micronúcleos e 500 células avaliadas por cultura para análise do IDN. # p = 0,0031; ### p = 0,0161; \*\* p = 0,0093.



**Figura 05** – Frequência média de células apoptóticas encontradas após tratamento de 24 horas com os extratos de *C. mollis*. **Cispl.:** Cisplatina 20 $\mu$ M; **ER1:** 0,2  $\mu$ g/mL; **ER2:** 2,0  $\mu$ g/mL; **ER3:** 20  $\mu$ g/mL; **ER4:** 200  $\mu$ g/mL; **EF1:** 0,2  $\mu$ g/mL; **EF2:** 2,0  $\mu$ g/mL; **EF3:** 20  $\mu$ g/mL; **EF4:** 200  $\mu$ g/mL. **ER** = Extrato etanólico da raiz da *C. mollis*; **EF** = Extrato etanólico da folha da *C. mollis*. Média de três culturas; análise de 500 células por cultura.

\*p (C.pos) = 0,0175 \*p (ER4) = 0,0107; \*p (EF4) = 0,0036.

**5 ARTIGO 2 – ARTIGO A SER SUBMETIDO AO PERIÓDICO *ARCHIVES OF TOXICOLOGY***

**Investigação da mutagenicidade dos extratos etanólicos de folha e raiz da planta medicinal *Coccoloba mollis* (Polygonaceae) no ensaio Salmonella/microsossoma e testes *in vivo*.**

Marcela S. Tsuboy<sup>1</sup>, Juliana C. Marcarini<sup>1</sup>, Dalva T. Ferreira<sup>2</sup>, Elisa R. A. Ferraz<sup>3</sup>, Farah M. D. Chequer<sup>3</sup>, Danielle P. de Oliveira<sup>3</sup>, Mário S. Mantovani<sup>1,\*</sup>.

<sup>1</sup>Departamento de Biologia Geral, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brasil.

<sup>2</sup>Departamento de Química, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brasil.

<sup>3</sup>Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brasil.

\* Dr. M. S. Mantovani  
Departamento de Biologia Geral – CCB  
Universidade Estadual de Londrina – Campus Universitário  
P.O. Box 6001, Londrina, Paraná, Brazil.  
CEP: 86051-990  
e-mail: [biomsm@uel.br](mailto:biomsm@uel.br)  
Phone: 55 43 3371-4977  
Fax: 55 43 3371-4207

## RESUMO

O uso das plantas medicinais pela população é uma prática antiga e ainda bastante difundida, o que faz com que estudos sobre sua possível atividade genotóxica/mutagênica sejam essenciais. A *Coccoloba mollis* é uma espécie que está sendo receitada como fitoterápico, principalmente em casos de falta de memória e estresse. Para a investigação de seu potencial mutagênico, os extratos etanólicos de folha e raiz foram submetidos ao ensaio *Salmonella*/microsoma e aos testes do cometa e micronúcleo *in vivo*. Somente o extrato da folha foi capaz de induzir danos no DNA da linhagem TA98 na ausência de S9 na maior concentração testada, embora em potência mutagênica muito baixa. Os tratamentos realizados nos camundongos Swiss também não induziram aumento estatisticamente significativo de danos no DNA. Os dados obtidos demonstram pela primeira vez que os extratos de folha e raiz da *Coccoloba mollis*, nas condições experimentais descritas, não apresentam mutagenicidade.

**Keywords:** Medicinal plant. *Coccoloba mollis*. Ames test. In vivo mutagenicity.

## 1. Introdução

O uso das plantas com fins medicinais é uma das formas mais antigas de prática medicinal da humanidade. Além de esta prática ser importante nos cuidados de saúde primários da população menos favorecida dos países em desenvolvimento, a procura pelos medicamentos de origem natural nos países desenvolvidos tem aumentado consideravelmente nas últimas décadas (WHO, 2000). Por isso, especial atenção deve ser dada à avaliação da segurança, efetividade e qualidade dos produtos naturais, sendo a avaliação da genotoxicidade/mutagenicidade dos agentes terapêuticos naturais, recomendada por órgãos regulatórios nacionais e internacionais (CNS, 1997; OECD, 2001).

Embora exista comprovação científica de inúmeros benefícios trazidos pelas plantas medicinais, seu uso pela população deve ser realizado de maneira cautelosa. Efeitos adversos podem surgir devido à toxicidade intrínseca, à adulteração, substituição, contaminação, identificação errônea do material vegetal, falta de fiscalização e interações com outras drogas (RATES 2001; ZHOU et al. 2004).

A *Coccoloba mollis* Casar. (Polygonaceae) é uma espécie que está sendo receitada como fitoterápico com o nome de “*Erva da memória*”. O insumo desta planta tem sido relatado como benéfico nos casos de falta de memória, estresse, insônia, anemias, queda de visão e impotência sexual. A espécie é popularmente conhecida como folha-de-bolo ou falso-novateiro e ocorre em cerradões e mata semidecídua da bacia do Paraná, na região centro-sul do Brasil (LORENZI 2002). As espécies do gênero *Coccoloba* têm sido utilizadas pela população brasileira como adstringente, no tratamento da febre, diarreia, gonorréia, hemorróidas, problemas menstruais e hemorragias uterinas (MORS et al., 2000; COTA et al., 2003), porém ainda são pouco estudadas, não existindo literatura até o presente momento sobre os efeitos biológicos que estas espécies possam ter em sistemas *in vitro* e *in vivo*. Considerando a falta de estudos envolvendo o gênero *Coccoloba* e a importância da avaliação científica das plantas medicinais popularmente utilizadas, o presente trabalho tem por objetivo analisar a genotoxicidade/mutagenicidade dos extratos etanólicos de folha e raiz da *Coccoloba mollis* através do ensaio *Salmonella*/microssoma (Teste de Ames) e em sistema-teste *in vivo* utilizando os testes do cometa e micronúcleo.

## 2 Materiais e Métodos

### *Extratos da Cocoloba Mollis*

As folhas e raízes da *C. mollis* foram submetidas à extração exaustiva com etanol e as soluções obtidas foram concentradas em evaporador rotatório produzindo os respectivos extratos, extrato etanólico da folha de *C. mollis* (EF) e extrato etanólico da raiz de *C. mollis* (ER).

No ensaio de mutagenicidade com *Salmonella*/microsoma, os extratos foram ressuspensos em dimetilsulfóxido (DMSO), obedecendo ao limite de concentração recomendado pela literatura (MORTELMANS; ZEIGER, 2000; SBMCTA, 2004). De acordo com essa recomendação, substâncias puras ou extratos devem ser testados até uma dose máxima de 5 mg/placa ou até seus respectivos limites de dissolução. Sendo assim, o ER foi testado na concentração de 5 mg/placa e o EF teve menor poder de dissolução, sendo a dose máxima de 3 mg/placa. Primeiramente o ensaio foi feito com cinco doses seguindo uma escala logarítmica a fim de visualizar a faixa de mutagenicidade caso esta se apresentasse. A partir desse ensaio preliminar, novas doses foram escolhidas.

Para a administração aos animais experimentais, cada um dos extratos (EF e ER) foi dissolvido em DMSO (Dimetilsulfóxido) e PBS (Phosphate Buffer Saline) sendo que a concentração de DMSO não ultrapassou 10% do volume total da solução mãe a ser preparada. Após, estas foram filtradas e esterilizadas utilizando-se uma unidade filtrante descartável de 22 µm de porosidade (Millex® – Millipore). A administração dos extratos aos animais ocorreu via gavagem.

### *Animais Experimentais*

Cinquenta e seis camundongos Swiss (*Mus musculus*) machos, com aproximadamente 30g de massa corporal, foram distribuídos em grupos controle e grupos experimentais, contendo sete animais por tratamento (totalizando oito grupos). Os mesmos foram mantidos no Biotério de Pequenos Mamíferos do Departamento de Biologia Geral do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina (CCB/UEL), em condições de temperatura ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ) e umidade controladas ( $55 \pm 10\%$ ), e 12 horas de ciclo claro/escuro.

Os animais receberam ração sólida e água *ad libitum* durante todo o período do experimento.

*Protocolos experimentais e procedimentos para o Ensaio Salmonella/microsoma (Teste de Ames)*

O protocolo utilizado foi o da pré-incubação segundo Maron e Ames (1983) e Mortelmans e Zeiger (2000), resumidamente: em tubos previamente esterilizados foram colocados 100  $\mu$  L de cultura de cada linhagem (109 células/mL), 100  $\mu$  L da solução de cada extrato em diferentes concentrações e 500  $\mu$  L de tampão fosfato 0,2 M para o ensaio na ausência de ativação metabólica ou o mesmo volume da mistura S9 para o ensaio na presença de ativação metabólica. Os tubos foram homogeneizados e incubados a 37°C por 30 minutos. Após esse tempo foram adicionados 2,0 mL de ágar de superfície, a mistura foi então homogeneizada e vertida em placa de Petri com 20 mL de ágar mínimo. As placas foram incubadas invertidas, por 66 horas em temperatura de 37°C ( $\pm 0,5$ ). O teste foi feito em triplicata. Para este estudo foram escolhidas as linhagens TA98 e TA100, que detectam a maioria dos compostos mutagênicos, sendo que a primeira detecta mutágenos que agem por deslocamento do quadro de leitura do DNA e a segunda identifica substâncias que causam substituição de pares de bases do material genético (MARON; AMES 1983).

DMSO foi usado como controle negativo. Como controle positivo nos testes sem S9 foi utilizado o 4-nitroquinolina-1-óxido (4NQO) em concentração de 0,5  $\mu$  g/placa. Para os testes realizados na presença de S9, o controle positivo foi o 2-aminoantraceno (2AA) em concentração de 2,5  $\mu$  g/placa.

Os resultados foram submetidos à análise estatística utilizando o programa *Salanal*, um programa desenvolvido pelo *Integrated Laboratory Systems, Research Triangle Park, N.C. USA* para análise estatística do teste de Ames, usando o modelo de Bernstein, que utiliza tanto a ANOVA quanto a regressão linear para fornecer a potência mutagênica das amostras analisadas (BERNSTEIN et al. 1982; UMBUZEIRO; VARGAS 2003).

*Protocolos experimentais e procedimentos para os Ensaio do Cometa e do Micronúcleo*

Os animais experimentais foram distribuídos em oito grupos: (1) controle negativo; (2) controle positivo (ciclofosfamida - 50 mg/Kg de peso corpóreo); (3/4) [EF1]/[ER1] (dose 1 dos EF e ER - 6,6x10<sup>-3</sup> mg/Kg de peso corpóreo); (5/6) [EF2]/[ER2] (dose 2 dos EF e ER - 6,6x10<sup>-2</sup> mg/Kg de peso corpóreo) e (7/8) [EF3]/[ER3] (dose 3 dos EF e ER - 6,6x10<sup>-1</sup> mg/Kg de peso corpóreo).

Os camundongos do grupo 1 (controle negativo) receberam PBS via gavagem e via intraperitoneal. Aos animais do grupo 2 (controle positivo) foi administrado PBS via gavagem e

ciclofosfamida (50 mg/Kg) intraperitonealmente. Os animais pertencentes aos grupos de avaliação da genotoxicidade e mutagenicidade dos extratos (3 a 8) receberam EF ou ER oralmente e PBS via intraperitoneal.

O teste do Cometa foi realizado de acordo com as premissas de Tice et al. 2000. Para a realização do teste, 20  $\mu$ L de sangue periférico foi coletado de cada animal por punção da veia caudal após 24 horas de aplicação dos tratamentos. Este material foi homogeneizado cuidadosamente com 120  $\mu$ L de agarose de baixo ponto de fusão (LMP 0,5%) a 37°C e depositado sobre uma lâmina pré-gelatinizada. Em seguida, as lâminas foram levadas para solução de lise por pelo menos 1h. Após desnaturação (20 minutos) e eletroforese alcalinas (25V, 300mA, 20 minutos), as lâminas foram neutralizadas, fixadas e mantidas sob refrigeração até o momento da análise. A coloração das lâminas foi feita com de brometo de etídeo e a análise foi feita visualmente em microscopia de fluorescência (filtro de excitação de 420-490 nm e filtro de barreira de 520 nm), de acordo com Kobayashi 1995. Cem células foram analisadas por lâmina/animal. Os cometas foram classificados em: *classe 0* – nucleóides que não apresentam cauda; *classe 1* – nucleóides com cauda menor que o diâmetro do nucleóide; *classe 2* – nucleóides com cauda de tamanho entre 1 a 2 vezes o diâmetro do nucleóide; *classe 3* – nucleóides com cauda 2 vezes maior que o diâmetro do nucleóide.

Para o teste do micronúcleo, lâminas pré-coradas com laranja de acridina receberam algumas gotas de sangue coletado pela veia caudal dos animais e foram rapidamente cobertas com lamínula (HAYASHI et al. 1990). Este procedimento foi feito depois de 48 horas da aplicação dos tratamentos aos animais (de acordo com resultados do controle positivo de nosso laboratório, onde o maior pico de indução de micronúcleos é encontrado). Foram avaliados 2000 reticulócitos por lâmina/animal em microscopia de fluorescência.

Os dados obtidos nos experimentos *in vivo* foram submetidos à análise de variância não paramétrica (Kruskall-Wallis) seguida de teste de Dunn, com  $\alpha = 0,05$  utilizando o programa GrafPad InStat® versão 3.02.

### 3. Resultados

No teste de Ames os resultados sugerem que somente o EF apresentou resposta mutagênica, mesmo assim, com uma potência muito baixa, 0,004 rev/ $\mu$  g. Este resultado foi observado com a linhagem TA98 na ausência de S9. Nas outras condições testadas o extrato não mostrou mutagenicidade (Tabela 1). Para a confirmação da resposta negativa, outras linhagens de *Salmonella* devem ser empregadas (Mortelmans e Zeiger 2000). Já o ER não apresentou potência mutagênica em nenhuma das condições testadas. Entretanto, com a linhagem TA98 na presença de S9, esta substância foi altamente tóxica para a *Salmonella* em todas as concentrações testadas ( $p \sim 1$ ) (Tabela 2).

Os resultados obtidos nos testes do Cometa e Micronúcleo sugerem que o tratamento dos animais com os extratos de folha e raiz da *Coccoloba mollis*, nas condições experimentais acima descritas, não apresentaram genotoxicidade e mutagenicidade.

A Figura 1 mostra os dados obtidos no Ensaio do Cometa. Nela podemos observar que houve aumento estatisticamente significativo apenas nos animais tratados com o agente indutor de danos no DNA, ciclofosfamida. O mesmo ocorreu na análise de micronúcleos em reticulócitos. Somente nos animais tratados com ciclofosfamida foi encontrado aumento estatisticamente significativo na frequência de micronúcleos (Tabela 3).

Uma relação dose-resposta pode ser estabelecida na genotoxicidade induzida por EF, porém o mesmo não ocorre nos grupos tratados com ER e nem quando consideramos os dados relativos à mutagenicidade dos extratos. No teste do micronúcleo, os animais tratados com EF2 e ER2 apresentaram frequência de micronúcleos maior que aqueles tratados com EF3 e ER3, o que pode ser indicativo de citotoxicidade dos extratos nesta dose.

#### 4. Discussão

O interesse pela fitoterapia geralmente é motivado pelo seu uso tradicional e por sua origem natural. Embora muitas atividades biológicas benéficas já tenham sido cientificamente comprovadas, o uso das plantas medicinais deve ser feito de maneira cautelosa pela população. Apesar da maioria dos fitoterápicos serem seguros se usados em doses recomendadas, efeitos advesos podem surgir (PHILLIPSON, 2007). Por isso, os testes de genotoxicidade/mutagenicidade como os aqui empregados são importantes na avaliação da segurança e efetividade dos produtos naturais (BAST et al., 2002). Testes *in vivo* e o ensaio *Salmonella*/microsoma são os mais frequentemente utilizados e recomendados na avaliação do perigo genético pelas agências reguladoras (FDA, 1997; OECD, 2001), uma vez que permitem considerar fatores do metabolismo *in vivo*, farmacocinética e processos de reparo do DNA (KRISHNA; HAYASHI, 2000) e que o ensaio *Salmonella*/microsoma possui alto valor preditivo para carcinogenicidade em roedores quando uma resposta mutagênica é obtida (MORTELMANS; ZEIGER, 2000).

A análise preliminar dos extratos de *C. mollis* pelo ensaio *Salmonella*/microsoma mostra que estes não apresentam mutagenicidade, exceto pela maior concentração testada do EF na linhagem TA98, na ausência de metabolização. Nestas condições, portanto, é possível que EF induza, embora com uma potência muito baixa, mudança de quadro de leitura do DNA, visto que este é o tipo de mutação detectada pela a linhagem TA98. O teste permitiu concluir também que o ER apresenta maior toxicidade que EF, devido à alta toxicidade apresentada na linhagem TA98, na presença de metabolização. Este resultado está em concordância com outros dados de citotoxicidade de nosso laboratório, onde o ER mostrou-se mais tóxico às células HTC do que o EF (dados não apresentados). Deste modo, a biotransformação dos compostos presentes em ER parece ser importante para sua toxicidade *in vitro*. Embora a migração do DNA e a frequência de reticulócitos micronucleados (MNRETs) tenham aumentado nos animais tratados com o EF e ER, estes não atingiram significância estatística.

Estudos ainda em andamento estão sendo realizados para detecção dos constituintes químicos presentes nos extratos etanólicos de folha e raiz da *Coccoloba mollis* aqui testados. Até o momento, duas antraquinonas foram isoladas do ER (emodina e fissiona), enquanto que hidrocarbonetos, ésteres de cadeia longa e o triterpeno 3-taraxerona foram caracterizados no EF (DE BARROS et al., 2007).

O uso da *C. mollis* como modulador da memória e tranqüilizante parece ter fundamento científico. Alguns estudos relatam a atividade tranqüilizante de extratos derivados de plantas da família Polygonaceae (GOSH et al. 2002), além do efeito protetor da emodina frente a distúrbios cerebrais (GU et al. 2000) e na consolidação da memória (LU et al., 2007), porém pouco ainda é descrito sobre a atividade genotóxica/mutagênica das antraquinonas, principalmente *in vivo*. Mueller e seus colaboradores atribuem atividade genotóxica à emodina (MUELLER et al., 1998; MUELLER; STOPPER, 1999; MUELLER et al, 1999), outros sugerem que ela seja antimutagênica (SUN et al., 2000; LEE et al., 2005). De acordo com os estudos realizados por Mueller e colaboradores (MUELLER et al., 1998; MUELLER; STOPPER, 1999; MUELLER et al, 1999), a mutagenicidade apresentada pela emodina pode ser explicada pela formação da 2-hidroxiemodina via CYP1A2 e CYP2B ou pela inibição da topoisomerase II devido a capacidade da emodina (que possui estrutura planar) de se intercalar ao DNA. A maior parte dos estudos conduzidos para investigação do possível efeito mutagênico das antraquinonas e de seus metabólitos em diferentes linhagens de *Salmonella typhimurium* mostraram mutagenicidade na linhagem TA1537 (TIKKANEN et al., 1983; MASUDA; UENO, 1984; MASUDA et al., 1985; MURAKAMI et al., 1987; WESTENDORF et al., 1990; KRIVOBOK et al., 1992). Apesar dos metabólitos da emodina e fissiona apresentarem mutagenicidade em linhagem TA1537 de *Salmonella* após metabolização, estas mesmas antraquinonas não foram mutagênicas nas linhagens TA100, TA98 e TA2638 na ausência e presença de metabolização (KRIVOBOK et al., 1992; MUELLER et al, 1999; LEE et al., 2005).

Embora muitos estudos de mutagenicidade *in vitro* apresentem resposta positiva, um longo estudo realizado pelo *National Toxicological Program* (NTP) do Instituto Nacional do Câncer americano concluiu que não há evidências de que a emodina possua atividade carcinogênica em ratos machos F344/N e fêmeas de camundongos B6C3F (NTP 2001). Mengs et al. (1997) também não observaram resposta mutagênica e citotóxica após única administração da maior dose permitida (2 mg/Kg b.w.) de emodina em células de medula óssea dos camundongos NMRI, reforçando assim a importância de estudos em diversos sistemas-testes para a obtenção de conclusões mais confiáveis. *In vivo*, a biotransformação das 1,8 diidroxiantraquinonas parece ocorrer nas células epiteliais do intestino e nas células hepáticas (MUELLER et al., 1998), sendo a biotransformação da emodina mediada pelas enzimas do citocromo P450 (TANAKA et al., 1987; GO et al., 2007). Longo et al. (2000), ao estudar os efeitos de diversas antraquinonas sobre as enzimas de metabolização no fígado e intestino de ratos observou que as 1,8 diidroxiantraquinonas são as que possuem a resposta

mais fraca na indução da CYP1A2, sendo esta indução significativa somente no fígado. Esta observação, juntamente com a possibilidade de os constituintes dos extratos ou de seus metabólitos serem isentos de mutagenicidade ou serem excretados antes de causarem dano pode explicar em parte os resultados não significativos encontrados *in vivo*. Por outro lado, é difícil afirmar ou mesmo sugerir a razão destes resultados, principalmente com relação ao EF, uma vez que pouco ainda é conhecido sobre a composição dos extratos.

Estudos adicionais seriam necessários para uma maior compreensão das atividades biológicas dos extratos de *C. mollis*. No entanto, os resultados preliminares apresentados pela primeira vez por nosso estudo podem ajudar a direcionar tais investigações e, contribuir futuramente para o registro e validação deste fitoterápico.

### **Agradecimentos**

Agradecemos ao Ms. Rodrigo Juliano Oliveira, da Universidade Estadual de Londrina (UEL), pela valiosa assistência durante os experimentos realizados *in vivo*.

## Referências

- Bast, A., Chandler, R. F., Choy, P. C., Delmulle, L. M., Gruenwald, J., Halkes, S. B. A., Keller, K., Koeman, J. H., Peters, P., Przyrembel, H., et al (2002). Botanical health products, positioning and requirements for effective and safe use. *Environ Toxicol and Pharmacol* 12: 195-211.
- Bernstein, L., Kaldor, J., McCann, J., Pike, M. C. (1982) An empirical approach to the statistical analysis of mutagenesis data from Salmonella test. *Mutat Res* 97: 267–281.
- CNS – Conselho Nacional De Saúde (1997) Resolução nº 251, 07/08/1997. <http://www.conselho.saude.gov.br/docs/Resolucoes/Reso251.doc>
- Cota, B. B., Oliveira, A. B., Souza-Filho, J. D., Braga, F. C. Antimicrobial activity and constituents of *Coccoloba acrostichoides*. *Fitoterapia* 74: 729-731. (2003).
- De Barros, I., Fidelis, Q. C., Santos, G. F., Pinto, J. P., Faccione, M., Tsuboy, M. S. F., Mantovani, M. S., Braz-Filho, R., Ferreira, D. T. (2007). Phytochemistry of root and leaf of *Coccoloba mollis*. In: First brazilian conference on natural products, São Pedro, São Paulo, Brasil.
- FDA – Food And Drug Administration. (1997) Guidance for industry S2B Genotoxicity: A standard battery for genotoxicity testing of pharmaceuticals. <http://www.fda.gov/CDER/GUIDANCE/1856fnl.pdf>
- Go, S. Y., Kwon, K. J., Park, S. N., Sheen, Y. Y. Genetic toxicity test of emodin by Ames, Micronucleus, Comet assays and microarray analysis showing differential result. *The J of Appl Pharmacol* 15: 192-198. (2007).
- Gosh, L., Arunachalam, G., Murugesan, T., Pal, M., Saba, B. P. Studies on the psychopharmacological activities of *Rumex nepalensis* Spreng root extract in rats and mice. *Phytomedicine* 9: 202-206. (2002).
- Gu, J., Zhang, X., Fei, Z., Wen, A., Qin, S., Yi, S., Chen, Y., Li, X. Rhubarb extracts in treating complications of severe cerebral injury. *Chin Med J* 113: 529-531. (2000).
- Hayashi, M., Morita, T., Kodama, Y., Sofuni, T., Ishidate Jr, M. The micronucleus assay with mouse peripheral reticulocytes using acridina orange-coated slides. *Mutat Res* 245: 245-249. (1990).
- Kobayashi, H., Sugiyama, C., Morikawa, Y., Hayashi, M., Sofuni, T. A comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the single cell gel electrophoresis assay. *MMS Commun* 3: 103-115. (1995).
- Krishna, G., Hayashi, M. In vivo rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. *Mutat Res* 455: 155-166. (2000).

- Krivobok, S., Seigle-Murandi, F., Steiman, R., Marzin, D. R., Betina, V. Mutagenicity of substituted anthraquinones in the Ames/Salmonella microsome system. *Mutat Res* 279 (1): 1-8. (1992).
- Longo, V., Amato, G., Salvetti, A., Gervasi, P. G. Heterogenous effects of anthraquinones on drug-metabolizing enzymes in the liver and small intestine of rat. *Chem-Biol Inter* 126: 63-77. (2000).
- Lorenzi, H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil, vol. 2. Nova Odessa: Instituto Plantaum, 2002.
- Lu, M., Hsieh, M., Wu, C., Cheng, H., Hsieh, C., Lin, Y., Peng, W. Ameliorating effect of emodin, a constitute of *Polygonatum multiflorum*, on cyclohexamide-induced impairment of memory consolidation in rats. *J of Ethnopharmacol* 112: 552-556. (2007).
- Maron, D. M., Ames, B. N. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat Res* 113:173-214. (1983).
- Masuda, T., Haraikawa, K., Morooka, N., Nakano, S., Ueno, Y. 2-Hydroxyemodin, an active metabolite of emodin in the hepatic microsomes of rats. *Mutat Res* 149 (3): 327-332. (1985).
- Masuda, T., Ueno, Y. Microsomal transformation of emodin into a direct mutagen. *Mutat Res* 125 (2): 135-144. (1984).
- Mengs, U., Krumbiegel, G., Völkner, W. Lack of emodin genotoxicity in the mouse micronucleus assay. *Mutat Res* 393: 289-293. (1997).
- Mors, W. B., Rizzini, C. T., Pereira, N. A. Medicinal plants of Brazil. DeFilipps RA (Ed.), 1st ed. Reference Publications. (2000).
- Mortelmans, K., Zeiger, E. The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. *Mutat Res* 455: 29-60. (2000).
- Mueller, S. O., Stopper, H. Characterization of the genotoxicity of anthraquinones in mammalian cells. *Biochim et Biophys Acta* 1428: 406-414. (1999).
- MUELLER, S. O., SCHMITT, M., DEKANT, W., STOPPER, H., SCHLATTER, J., SCHREIRER, P., LUTZ, W. K. Occurrence of emodin, chrysophanol and physcion in vegetables, herbs and liquors. Genotoxicity and Anti-genotoxicity of the anthraquinones and of the whole plants. *Food and Chem Toxicol* 37: 481-491. (1999).
- Mueller, S. O., Stopper, H., Dekant, W. Biotransformation of the anthraquinones emodin and chrysophanol by cytochrome P450 enzymes. Bioactivation to genotoxic metabolites. *Drug Metabol and Dispos* 26: 540-546. (1998).

- Murakami, H., Kobayashi, J., Masuda, T., Morooka, N., Ueno, Y. Omega-Hydroxyemodin, a major hepatic metabolite of emodin in various animals and its mutagenic activity. *Mutat Res* 180 (2): 147-153. (1987).
- NTP – National Toxicology Program. NTP toxicology and carcinogenesis studies of emodin (CAS NO. 518-82-1) feed studies in F344/N rats and B6C3F1 mice. *Natl. Toxicol. Program Tech. Ser.* 493: 1-278. (2001).
- OECD – Organisation For Economic Co-Operation And Development. (2001). Harmonized integrated classification system for human health and environmental hazards of chemical substances and mixtures. <http://www.oecd.org/dataoecd/48/51/37182285.pdf>
- Phillipson, J. D. Phytochemistry and pharmacognosy. *Phytochemistry* 68: 2960–2972. (2007).
- Rates, S. M. K. Plants as source of drugs. *Toxicon* 39: 603-613. (2001).
- SBMCTA – Sociedade Brasileira De Mutagênese, Carcinogênese E Teratogênese Ambiental. (2004) Orientações básicas de execução de testes de mutagenicidade para proteção da saúde humana e do meio ambiente. <http://www.sbmcta.org.br/index.php?arq=doc01>.
- Sun, M., Sakakibara, H., Ashida, H., Danno, G., Kanazawa, K. Cytochrome P450A1-inhibitory action of antimutagenic anthraquinones in medicinal plants and the structure-activity relationship. *Biosci Biotechnol Biochem* 64: 1373-1378. (2000).
- Tanaka, H., Morooka, N., Haraikawa, K., Ueno, Y. Metabolic activation of emodin in the reconstituted cytochrome P-450 system of the hepatic microsomes of rats. *Mutat Res* 176(2):165-70. (1987).
- Tice, R. R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J. C., Sasaki, Y. F. Single Cell Gel/Comet assay: Guideline for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. *Environ and Mol Mutag* 35: 206-221. (2000).
- Tikkanen, L., Matsushima, T., Natori, S. Mutagenicity of anthraquinones in the Salmonella preincubation test. *Mutat Res* 116(3-4): 297-304. (1983).
- Umbuzeiro, G. A., Vargas, V. M. F. Teste de mutagenicidade com *Salmonella typhimurium* (Teste de Ames) como indicador de carcinogenicidade em potencial para mamíferos. In: Ribeiro LR, Salvadori DMF, Marques EK (Ed.) *Mutagênese Ambiental* Porto Alegre: Editora da ULBRA, 2003. pp. 81-112.
- Westendorf, J., Marquardt, H., Poginsky, B., Dominiak, M., Schmidt, J., Marquardt, H. Genotoxicity of naturally occurring hydroxyanthraquinones. *Mutat Res* 240 (1): 1-12. (1990).
- WHO – World Health Organisation. General guidelines for methodologies on research and evaluation of traditional medicine. (2000).

Zhou, S., Koh, H., Gao, Y., Gong, Z., Lee, E. J. D. Herbal bioactivation: The good, the bad and the ugly. *Life Sci* 74: 935-968. (2004).

**Tabela 01** – Dados brutos da avaliação da mutagenicidade do extrato da folha de *C. mollis* (EF) com as linhagens de *Salmonella typhimurium* TA98 e TA100 na ausência e presença de ativação metabólica (S9).

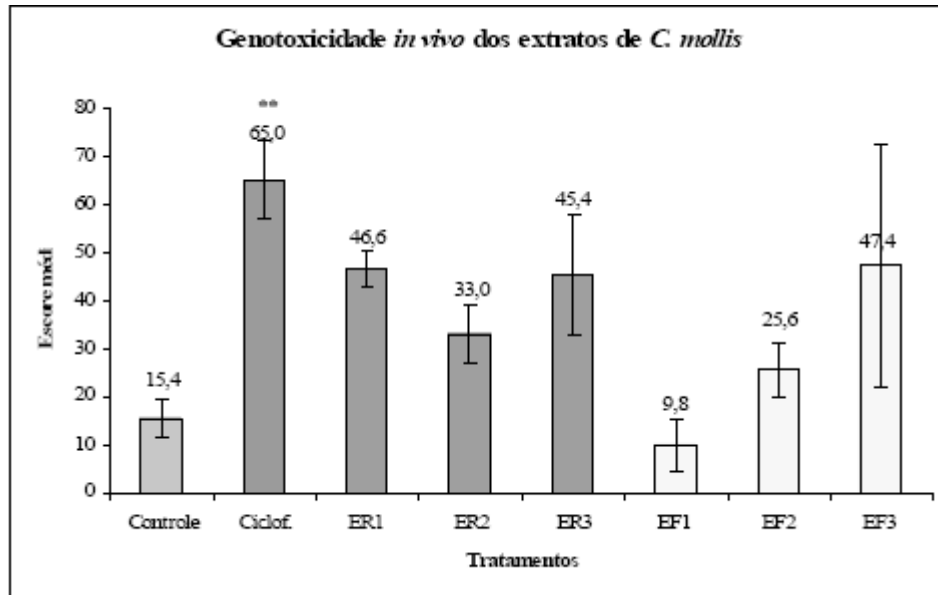
Doses ( $\mu\text{g/placa}$ )	TA98 – S9	TA 98+ S9	Doses ( $\mu\text{g/placa}$ )	TA100 – S9	TA 100 + S9
0	18 $\pm$ 3,0	33,33 $\pm$ 6,11	0	139 $\pm$ 3,0	102,33 $\pm$ 2,89
0,3	16,67 $\pm$ 1,53	32 $\pm$ 2,65	3	140,33 $\pm$ 5,03	101,67 $\pm$ 6,66
3	17,67 $\pm$ 1,53	34 $\pm$ 3,61	30	142 $\pm$ 9,54	107,33 $\pm$ 4,51
30	19 $\pm$ 2,0	33,67 $\pm$ 4,16	300	138,33 $\pm$ 5,86	104,67 $\pm$ 8,02
300	23,67 $\pm$ 1,15	35,67 $\pm$ 2,08	1000	140 $\pm$ 11,36	116,33 $\pm$ 15,37
3000	31,33* $\pm$ 4,16*	41 $\pm$ 5,57	2000	148,67 $\pm$ 16,26	114,33 $\pm$ 9,71

\* significante a 1%

**Tabela 02** – Dados brutos da avaliação da mutagenicidade do extrato da raiz de *C. mollis* (ER) com as linhagens *Salmonella typhimurium* TA98 e TA100 na ausência e presença de ativação metabólica (S9).

Doses ( $\mu\text{g/placa}$ )	TA98 – S9	Doses ( $\mu\text{g/placa}$ )	TA 98+ S9	Doses ( $\mu\text{g/placa}$ )	TA100 – S9	TA 100 + S9
0	24,33 $\pm$ 4,51	0	33,33 $\pm$ 6,11	0	139 $\pm$ 3,0	102,33 $\pm$ 2,89
5	19 $\pm$ 2,65	0,005	T	5	139,33 $\pm$ 4,51	108 $\pm$ 5,57
50	17,67 $\pm$ 2,08	0,05	T	50	142 $\pm$ 4,36	116,67 $\pm$ 7,09
500	21,67 $\pm$ 2,52	0,1	T	100	144 $\pm$ 6,0	117 $\pm$ 7,0
3000	19,67 $\pm$ 2,08	0,25	T	200	140,33 $\pm$ 4,51	116 $\pm$ 9,85
4000	21,33 $\pm$ 1,53	0,5	T	300	151 $\pm$ 9,54	114 $\pm$ 8,89

T = Tóxico



**Figura 01** – Escore médio de cometas observado em células de sangue periférico de camundongos Swiss machos após tratamento de 24 horas com os extratos de *C. mollis*. **Controle:** PBS; **Ciclof.:** ciclofosfamida – 50 mg/Kg; **ER1:** 6,6x10<sup>-3</sup> mg/Kg; **ER2:** 6,6x10<sup>-2</sup> mg/Kg; **ER3:** 6,6x10<sup>-1</sup> mg/Kg; **EF1:** 6,6x10<sup>-3</sup> mg/Kg; **EF2:** 6,6x10<sup>-2</sup> mg/Kg; **EF3:** 6,6x10<sup>-1</sup> mg/Kg. **ER** = Extrato etanólico da raiz da *C. mollis*; **EF** = Extrato etanólico da folha da *C. mollis*. \*\* p < 0,01

**Tabela 03** – Avaliação da mutagenicidade dos extratos de *C. mollis* após 48h de tratamento dos animais. Número de animais tratados, total de células contabilizadas, número total de MNRETs e frequência de micronúcleos encontrada.

Tratamento	n	Total de células Analisadas*	Total de células com MN (MNRETs)	fi MN Média ± Desvio Padrão
Controle	7	10.000	37	7,4 ± 2,88
Ciclofosfamida	7	8.000	132	33,0 ± 5,29 **
ER1	7	14.000	66	9,42 ± 3,73
ER2	7	10.000	67	13,4 ± 7,23
ER3	7	14.000	82	11,71 ± 6,1
EF1	7	14.000	82	11,71 ± 3,49
EF2	7	14.000	126	18,0 ± 7,07
EF3	7	14.000	88	12,57 ± 5,85

Ciclofosfamida 50 mg/Kg

\* Número variável devido à perda de material e não por morte dos animais durante o experimento.

\*\*  $p < 0,01$

## REFERÊNCIAS

<sup>1</sup>FERREIRA, D. T. (comunicação pessoal). Profa. Dra. Dalva Trevisan Ferreira, responsável pelo Laboratório de Pesquisas em Moléculas Bioativas, pertencente ao Departamento de Química da Universidade Estadual de Londrina, UEL e coordenadora do estudo fitoquímico dos extratos da *Coccoloba mollis*.

AARDEMA, M. J., KIRSCH-VOLDERS, M. The in vitro micronucleus assay. In: CHOY WN (Ed). **Genetic Toxicology and Cancer Risk Assessment**. 1st edition. New York: Marcel Dekker, 2001, p. 163-186.

ABAD, M. J., ANSUATEGUI, M., BERMEJO, P. Active antifungal substances from natural sources. **ARKIVOC**, 7: 116-145, 2007.

AHMED, B., AL-HOWIRINY, T. A., MOSSA, J. S. Crotalic and emarginelic acids: Two triterpenes from *Crotalaria emarginella* and anti-inflammatory and anti-hepatotoxic activity of crotalic acid. **Phytochemistry**, 67: 956–964, 2006.

ALBERTS, D. S., COLVIN, O. M., CONNEY, A. H., ERNSTER, V. L., GARBER, J. E., GREENWALD, P., GUDAS, L. J., HONG, W. K., KELLOFF, G. J., KRAMER, R. A., LERMAN, C. E., MANGELSDORF, D. J., MATTER, A., MINNA, J. D., NELSON, W. G., PEZZUTO, J. M., PRENDERGAST, F., RUSCH, V. W., SPORN, M. B., WATTENBERG, L. W., WEINSTEIN, I. B. Prevention of Cancer in the next millennium: Report of the Chemoprevention Working Group to the American Association for Cancer Research, **Cancer Research**, 59: 4743-4758, 1999.

ASSIMOPOULOU, A. N., ZLATANOS, S. N., PAPAGEORGIOU, V. P. Antioxidant activity of natural resins and bioactive triterpenes in oil substrates. **Food Chemistry**, 92: 721–727, 2005.

BANDARANAYAKE, W. M. Quality control, screening, toxicity and regulation of herbal drugs. In: AHMAD, I., AQIL, F., OWAIS, M. (Ed.). **Modern Phytomedicine: turning medicinal plants into drugs**. 1st edition. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2006, p. 25-58.

BARTSCH, H., TOMATIS, L. Comparison between carcinogenicity and mutagenicity based on chemicals evaluated in the IARC monographs. **Environmental Health Perspectives**, 47: 305-317, 1983.

BAST, A., CHANDLER, R. F., CHOY, P. C., DELMULLE, L. M., GRUENWALD, J., HALKES, S. B. A., KELLER, K., KOEMAN, J. H., PETERS, P., PRZYREMBEL, H. Botanical health products, positioning and requirements for effective and safe use. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, 12: 195-211, 2002.

BERNSTEIN, L., KALDOR, J., MCCANN, J., PIKE, M. C. An empirical approach to the statistical analysis of mutagenesis data from Salmonella test. **Mutation Research**, 97: 267-281, 1982.

BURLINSON, B., TICE, R. R., SPEIT, G., AGURELL, E., BRENDLER-SCHWAAB, S. Y., COLLINS, A. R., ESCOBAR, P., HONMA, M., KUMARAVEL, T. S., NAKAJIMA, M., SASAKI, Y. F., THYBAUD, V., UNO, Y., VASQUES, M., HARTMANN, A. Fourth International Workshop on Genotoxicity testing: Results of the in vivo Comet assay workgroup. **Mutation Research**, 627: 31-35, 2007.

CALAPAI, G., CAPUTI, A. P. Herbal medicines: Can we do without pharmacologist? **eCAM**, 4: 41-43, 2007.

CAPASSO, R., IZZO, A. A., PINTO, L., BIFULCO, T., VITOBELLO, C., MASCOLO, N. Phytotherapy and quality of herbal medicines. **Fitoterapia**, 71: S58-S65, 2000.

CASTELL, J. V., GÓMEZ-LECHÓN, M. J., PONSODA, X., BORT, R. The use of cultured hepatocytes to investigate the mechanisms of drug hepatotoxicity. **Cell Biology and Toxicology**, 13: 331-338, 1997.

CHANG, J. S., LIU, H. W., WANG, K. C., CHEN, M. C., CHIANG, L. C., HUA, Y. C., LIN, C. C. Ethanol extract of *Polygonum cuspidatum* inhibits hepatitis B in a stable HBV-producing cell-line. **Antiviral Research**, 66: 29-34, 2005.

CHAVEZ, M. L., JORDAN, M. A., CHAVEZ, P. I. Evidence-based drug-herbal interactions. **Life Sciences**, 78: 2146-2157, 2006.

CHOY, W. N. Genotoxic and non-genotoxic mechanisms of carcinogenesis. In: CHOY, W. N. (Ed). **Genetic Toxicology and Cancer Risk Assessment**. 1st edition. New York: Marcel Dekker, 2001, p. 47-72.

CHOY, W. N. Regulatory genetic toxicology tests. In: CHOY, W. N. (Ed). **Genetic Toxicology and Cancer Risk Assessment**. 1st edition. New York: Marcel Dekker, 2001, p. 93-114.

CNS – CONSELHO NACIONAL DE SAÚDE. Resolução nº 251, 07/08/1997. Disponível em: < <http://conselho.saude.gov.br/docs/Resolucoes/Reso251.doc> >. Acesso em: 12 nov. 07.

COLLINS, A. R., DUTHIE, S. J., DOBSON, V. L. Direct enzymic detection of endogenous oxidative base damage in human lymphocyte DNA. **Carcinogenesis**, 14(9): 1733-1735, 1993.

COLLINS, A. R. The comet assay for DNA damage and repair. **Molecular Biotechnology**, 26:249-261, 2004.

COLLINS, A. R., DOBSON, V. L., DUSINKÁ, M., KENNED, Y. G., STETINA, R. The comet assay: what can it really tell us? **Mutation Research**, 375: 183-193, 1996.

COS, P., HERMANS, N., DE BRUYNE, T., APERS, S., SINDAMBIWE, J. B., WITVROUW, M., DE CLERCQ, E., VANDEN-BERGHE, D., PIETERS, L., VLIETINCK, A. J. Antiviral activity of Rwandan medicinal plants against human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1). **Phytomedicine**, 9: 62-68, 2002.

COTA, B. B., OLIVEIRA, A. B., SOUZA-FILHO, J. D., BRAGA, F. C. Antimicrobial activity and constituents of *Coccoloba acrostichoides*. **Fitoterapia**, 74: 729-731, 2003.

CUNHA, W. R., MARTINS, C., FERREIRA, D. S., CROTTI, A. E. M., LOPES, N. P., ALBUQUERQUE, S. In vitro trypanocidal activity of triterpenes from miconia species. **Planta Medica**, 69 (5): 470-472, 2003.

DE BARROS, I., SANTOS, G. F., PINTO, J. P., FACCIONE, M., IWASSO, D. R., REZENDE, M. I., DANIEL, J. F. S., BRAZ-FILHO, R., FERREIRA, D. T. Constituintes químicos e atividade microbiana de *Coccoloba mollis*. In: **31ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, 2008, Águas de Lindóia, São Paulo, Brasil.

DE BARROS, I., FIDELIS, Q. C., SANTOS, G. F., PINTO, J. P., FACCIONE, M., TSUBOY, M. S. F., MANTOVANI, M. S., BRAZ-FILHO, R., FERREIRA, D. T. Phytochemistry of root and leaf of *Coccoloba mollis*. In: **First brazilian conference on natural products**, 2007, São Pedro, São Paulo, Brasil.

DE FLORA, S., FERGUNSON, L. R. Overview of mechanisms of cancer chemopreventive agents. **Mutation Research**, 591: 8-15, 2005.

EISENBRAND, G., POOL-ZOBEL, B., BAKER, V., BALLS, M., BLAAUBOER, B. J., BOOBIS, A., CARERE, A., KEVEKORDES, S., LHUGUENOT, J. C., PIETERS, R., KLEINER, J. Methods of in vitro toxicology. **Food and Chemical Toxicology**, 40: 193-236, 2002.

ELMORE, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicologic Pathology**, 35(4):495-516, 2007. **EMBRAPA/CENARGEN**, Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuárias. Conservação de Recursos Genéticos de Plantas Medicinais e aromáticas Disponível em: <<http://www.cenargen.embrapa.br/recgen/plantasmed.html>>. Acesso em: 28 out 2004.

FALKENBERG, M. B. Quinonas. In: SIMÕES, C. M. °, SCHENKEL, E. P., GOSMANN, G., MELLO, J. C. P., MENTZ, L. A., PETROVICK, P. R. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5ª ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2004, p. 657-684.

FARNSWORTH, N., AKERELE, A. O., BINGEL, A. S., SOEJARTO, D. D., GUO, Z. **Bulletin WHO**, 63: 965–981, 1985.

FDA – FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Guidance for industry S2B Genotoxicity: A standard battery for genotoxicity testing of pharmaceuticals, 1997. Disponível em: <<http://www.fda.gov/CDER/GUIDANCE/1856fml.pdf>> Acesso em: 01 dez. 2007

FENECH, M., HOLLAND, N., CHANG, W. P., ZEIGER, E., BONASSI, S. The Human Micronucleus Project – An international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. **Mutation Research**, 428: 271-283, 1999.

FENECH, M. Chromosomal biomarkers of genomic instability relevant to cancer. **Drug Discovery Today**, 7: 1128-1137, 2002.

FENECH, M. Commentary on the SFTG international collaborative study on the in vitro micronucleus test: To Cyt-B or not to Cyt-B? **Mutation Research**, 607: 9-12, 2006b.

FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a “cytome” assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death. **Mutation Research**, 600: 58-66, 2006a.

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research**, 455: 81-95, 2000.

FERREIRA, D. T., PINTO, J. P., FIDELIS, Q. C., SANTOS, G. F., BRAZ-FILHO, R. Antraquinonas farmacologicamente ativas isoladas de *Coccoloba mollis* CASAR – Polygonaceae. In: **30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, 2007, Águas de Lindóia, São Paulo, Brasil.

FOTAKIS, G., TIMBRELL, J. A. In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. **Toxicology Letters**, 160: 171-177, 2006.

FRESHNEY, I. Application of cell cultures to toxicology. **Cell Biology and Toxicology**, 17:213-230, 2001.

FUGH-BERMAN, A. Herb-drug interactions. **Lancet**, 355: 134-138, 2000.

GESCHER, A. J., SHARMA, R.A., STEWARD, W. P. Cancer chemoprevention by dietary constituents: a tale of failure and promise. **The Lancet Oncology**, 2: 371-379, 2001.

GICHNER, T., PLEWA, M. Induction of somatic DNA damage as measured by single cell gel electrophoresis and point mutation in leaves of tobacco plants. **Mutation Research**, 401(1-2):143-52, 1998.

GO, S. Y., KWON, K. J., PARK, S. N., SHEEN, Y. Y. Genetic toxicity test of emodin by Ames, Micronucleus, Comet assays and microarray analysis showing differential result. **The Journal of Applied Pharmacology**, 15: 192-198, 2007.

GO, V. L. W., NGUYEN, C. T. H., HARRIS, D. M., LEE, P. W. Nutrient-gene interaction: metabolic genotype-phenotype relationship. **Journal of Nutrition**, 135: 3016S-3020S, 2005.

GONTIJO, A. M. M. C., TICE, R. Teste do cometa para a detecção de dano no DNA e reparo em células individualizadas. In: RIBEIRO, L. R., SALVADORI, D. M. F., MARQUES, E. K., (Ed.). **Mutagênese Ambiental**. 1ª ed. Canoas: Editora da ULBRA, 2003, p. 247-271.

GOSH, L., ARUNACHALAM, G., MURUGESAN, T., PAL, M., SABA, B. P. Studies on the psychopharmacological activities of *Rumex nepalensis* Spreng root extract in rats and mice. **Phytomedicine**, 9: 202-206, 2002.

GU, J., ZHANG, X., FEI, Z., WEN, A., QIN, S., YI, S., CHEN, Y., LI, X. Rhubarb extracts in treating complications of severe cerebral injury. **Chinese Medical Journal**, 113: 529-531, 2000.

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular Aspects of Medicine**, 27: 1-93, 2006.

HALLIWELL, B. Oxidative stress in cell culture: an under-appreciated problem? **FEBS Letters**, 540: 3-6, 2003.

HANAHAN, D., WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, 100: 57-70, 2000.

HARTMANN, A., AGURELL, E. A., BEEVERS, C., BRENDLER-SCHWAAB, S., BURLINSON, B., CLAY, P., COLLINS, A., SMITH, A., SPEIT, G., THYBAUD, V., TICE, R. R. Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline Comet assay. **Mutagenesis**, 18: 45-51, 2003.

HAYASHI, M., MORITA, T., KODAMA, Y., SOFUNI, T., ISHIDATE Jr, M. The micronucleus assay with mouse peripheral reticulocytes using acridina orange-coated slides. **Mutation Research**, 245: 245-249, 1990.

HEDDLE, J. A. A rapid *in vivo* test for chromosomal damage. **Mutation Research**, 18:187-190, 1973.

HODGSON, E., LEBLANC, G. A., MEYER, S. A., SMART, R. C. Introduction to Biochemical and Molecular Methods in Toxicology. In: HODGSON E (Ed.). **A textbook of modern toxicology**. 3rd edition. New Jersey: John Wiley & Sons, 2004, p. 13-22.

HONMA, M., SOFUNI, T. The mouse lymphoma assay (MLA) using the microwell method. In: CHOY WN (Ed). **Genetic Toxicology and Cancer Risk Assessment**. 1st edition. New York: Marcel Dekker, 2001, p. 47-72.

HOSTETTMANN, K., MARSTON, A. Twenty years of research into medicinal plants: results and perspectives. **Phytochemistry Reviews**, 1: 275-285, 2002.

IARMARCOVAI, G., BONASSI, S., BOTTA, A., BAAN, R. A., ORSIÈRE, T. Genetic polymorphisms and micronucleus formation: a review of the literature. **Mutation Research**, 658: 215-233, 2008.

JING, X., UEKI, N., CHENG, J., IMANISHI, H., HADA, T. Induction of apoptosis in hepatocellular carcinoma cell lines by emodin. **Japanese Journal of Cancer Research**. 93:874-882, 2002.

JONES, B., STACEY, G. Safety considerations for *in vitro* toxicology testing. **Cell Biology and Toxicology**, 17: 247-270, 2001.

JOSEPHY, P. D. Chemical Mutagenesis. In: JOSEPHY PD. **Molecular Toxicology**. New York: Oxford University Press, 1997, p. 281-308.

KASSIE, F., PARZEFALL, W., KNASMÜLLER, S. Single cell gel electrophoresis assay: a new technique for human biomonitoring studies. **Mutation Research**, 463: 13-31, 2000.

KHAN, I. A. Issues related to botanicals. **Life Sciences**, 78: 2033-2038, 2006.

KIRSCH-VOLDERS, M., VANHAUWAERT, A., EICHENLAUB-RITTER, U., DECORDER, I. Indirect mechanisms of genotoxicity. **Toxicology Letters**, 140-141: 63-74, 2003.

KOBAYASHI, H., SUGIYAMA, C., MORIKAWA, Y., HAYASHI, M., SOFUNI, T. A comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the single cell gel electrophoresis assay. **MMS Communications**, 3: 103-115, 1995.

KRICHER, J. C. The neotropical pharmacy. In: **A neotropical companion. An introduction to animals, plants and ecosystems of the New World tropics**. 2nd ed. New Jersey : Princeton University Press. 1997, p.144-168.

KRISHNA, G., HAYASHI, M. In vivo rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. **Mutation Research**, 455: 155-166, 2000.

KRIVOBOK, S., SEIGLE-MURANDI, F., STEIMAN, R., MARZIN, D. R., BETINA, V. Mutagenicity of substituted anthraquinones in the Ames/Salmonella microsome system. **Mutation Research**, 279 (1): 1-8, 1992.

KUO, Y., SUN, C., OU, J., TSAI, W. A tumor cell growth inhibitor from *Polygonum hypoleucum* OHWI. **Life Sciences**, 61: 2335-2344, 1997.

LEE, N., CHOI, J., KOO, B., RYU, S., HAN, Y., LEE, S., LEE, D. Antimutagenicity and citotoxicity of the constituents from the aerial parts of *Rumex acetosa*. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, 28: 2158-2161, 2005.

LONGO, V., AMATO, G., SALVETTI, A., GERVASI, P. G. Heterogenous effects of anthraquinones on drug-metabolizing enzymes in the liver and small intestine of rat. **Chemico-Biological Interactions**, 126: 63-77, 2000.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil, vol. 2**. Nova Odessa, Instituto Plantaum, 2002.

LU, M., HSIEH, M., WU, C., CHENG, H., HSIEH, C., LIN, Y., PENG, W. Ameliorating effect of emodin, a constitute of *Polygonatum multiflorum*, on cyclohexamide-induced impairment of memory consolidation in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, 112: 552-556, 2007.

MACIEL, M. A. M., PINTO, A. C., VEIGA JR, V. F. Plantas medicinais: A necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, 25(3): 429-438 2002.

MARON, D. M., AMES, B. N. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. **Mutation Research**, 113:173-214, 1983.

MASUDA, T., HARAICAWA, K., MOROOKA, N., NAKANO, S., UENO, Y. 2-Hydroxyemodin, an active metabolite of emodin in the hepatic microsomes of rats. **Mutation Research**, 149 (3): 327-332, 1985.

MASUDA, T., UENO, Y. Microsomal transformation of emodin into a direct mutagen. **Mutation Research**, 125 (2): 135-144, 1984.

MATEUCA, R., LOMBAERT, N., AKA, P. V., DECORDER, I., KIRSCH-VOLDERS, M. Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring. **Biochimie**, 88: 1515-1531, 2006.

MATSUDA, H., SHIMODA, H., MORIKAWA, T., YOSHIKAWA, M. Phytoestrogens from the roots of *Polygonum cuspidatum* (Polygonaceae): structure-requirement of hydroxyanthraquinones for estrogenic activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, 11: 1839-1842, 2001.

McCANN, J., CHOI, E., YAMASAKI, E., AMES, B. N. Detection of carcinogens as mutagens in the Salmonella/microsome test: assay of 300 chemicals. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 72 (12): 5135-5139, 1975.

MELO, E. As espécies de *Coccoloba* P. Browne (Polygonaceae) da Amazônia brasileira. **Acta Amazonica**, 34(4): 525-551, 2004.

MENGS, U., KRUMBIEGEL, G., VÖLKNER, W. Lack of emodin genotoxicity in the mouse micronucleus assay. **Mutation Research**, 393: 289-293, 1997.

MERSH-SUNDERMANN, V., KNASMÜLLER, S., WU, X., DARROUDI, F., KASSIE, F. Use of human-derived liver cell line for the detection of cytoprotective, antigenotoxic and cogenotoxic agents. **Toxicology**, 198: 329-340, 2004.

MILNER, J. A. Strategies for cancer prevention: the role of diet. **British Journal of Nutrition**, 87 (2): S265-272, 2002.

MORLEY, A. A., TURNER, D. R. The contribution of exogenous and endogenous mutagens to in vivo mutations. **Mutation Research**, 428: 11-15, 1999.

MOROOKA, N., NAKANO, S., ITOI, N., UENO, Y. The chemical structure and the mutagenicity of emodin metabolites. **Agricultural and Biological Chemistry**, 54(5): 1247-1252, 1990.

MORS, W. B., RIZZINI, C. T., PEREIRA, N. A. **Medicinal plants of Brazil**. DeFilipps, R. A. (Ed.), 1st ed. Reference Publications, 2000.

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

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation cytotoxic assays. **Journal of Immunological Methods**, 65: 55-63, 1983.

MUELLER, S. O. STOPPER, H. Characterization of the genotoxicity of anthraquinones in mammalian cells. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1428: 406-414, 1999.

MUELLER, S. O., SCHMITT, M., DEKANT, W., STOPPER, H., SCHLATTER, J., SCHREIRER, P., LUTZ, W. K. Occurrence of emodin, chrysophanol and physcion in vegetables, herbs and liquors. Genotoxicity and Anti-genotoxicity of the anthraquinones and of the whole plants. **Food and Chemical Toxicology**, 37: 481-491, 1999.

MUELLER, S. O., STOPPER, H., DEKANT, W. Biotransformation of the anthraquinones emodin and chrysophanol by cytochrome P450 enzymes. Bioactivation to genotoxic metabolites. **Drug Metabolism and Disposition**, 26: 540-546, 1998.

MULLER, L., KASPER, P., SCHECHTMAN, L. ICH Guidances on Genotoxicity and Carcinogenicity: Scientific Background and Regulatory Practice. In: CHOY WN (Ed). **Genetic Toxicology and Cancer Risk Assessment**. 1st edition. New York: Marcel Dekker, 2001, p. 187-235.

MURAKAMI, H., KOBAYASHI, J., MASUDA, T., MOROOKA, N., UENO, Y. omega - Hydroxyemodin, a major hepatic metabolite of emodin in various animals and its mutagenic activity. **Mutation Research**, 180 (2): 147-153, 1987.

MUSARRAT, J., AQIL, F., AHMAD, I. Mutagenicity and Antimutagenicity of Medicinal Plants. In: AHMAD, I., AQIL, F., OWAIS, M. (Ed.). **Modern Phytomedicine: turning medicinal plants into drugs**. 1st edition. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2006, p. 271-292.

NELSON, S. M., FERGUNSON, L. R., DENNY, W. A. DNA and the chromosome – varied targets for chemotherapy. **Cell & Chromosome**, 3: 1-26, 2004.

NTP – NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM. NTP toxicology and carcinogenesis studies of emodin (CAS NO. 518-82-1) feed studies in F344/N rats and B6C3F1 mice. **National Toxicology Program Technical Report Series**, 493: 1-278, 2001.

OECD – ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. Harmonized integrated classification system for human health and environmental hazards of chemical substances and mixtures, 2001. Disponível em: <<http://www.oecd.org/dataoecd/48/51/37182285.pdf>> Acesso em: 07 set. 2007.

OECD – ORGANISATION FOR ECONOMIC CO - OPERATION AND DEVELOPMENT. OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS. DRAFT PROPOSAL FOR A NEW GUIDELINE 487: *In Vitro* Mammalian Cell Micronucleus Test (mnvit), 2007. Disponível em: < <http://www.oecd.org/dataoecd/38/58/39780112.doc>> Acesso em: 07 set. 2007.

OLIVEIRA, J. M., JORDÃO, B. Q., RIBEIRO, L. R., FERREIRA da EIRA, A., MANTOVANI, M. S. Anti-genotoxic effect of aqueous extracts of sun mushroom (*Agaricus blazei* Murril lineage 99/26) in mammalian cells in vitro. **Food and Chemical Toxicology**, 40: 1775-1780, 2002.

OLSEN, B. B., BJORLING-POULSEN, M., GUERRA, B. Emodin negatively affects the phosphoinositide 3-kinase/AKT signalling pathway : A study on its mechanisms of action. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, 39: 227-237, 2007.

ÖSTLING, O., JOHANSON, K. J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damage in individual mammalian cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 123(1): 291-298, 1984.

OVESNÁ, Z., VACHÁLKOVÁ, A., HORVÁTHOVÁ, K., TÓTHOVÁ, D. Pentacyclic triterpenic acids: new chemoprotective compounds: Minireview. **Neoplasma**, 51(5): 327-333, 2004.

PHILLIPSON JD. Phytochemistry and pharmacognosy. **Phytochemistry**, 68: 2960–2972, 2007.

PLENCHETTE, S., FILOMENO, R., LOGETTE, E., SOLIER, S., BURON, N., CATHELIN, S., SOLARY, E. Analyzing markers of apoptosis in vitro. In: SCHÖNTALL AH (Ed.). **Checkpoints control and cancer. Activation and Regulation Protocols**, 1st ed. New Jersey: Humana Press, 2004, p. 313-332.

RABELLO-GAY, M. N., RODRIGUES, M. A. R. **Mutagênese, Carcinogênese e Teratogênese: métodos e critérios de avaliação**. Ribeirão Preto: Ed. Sociedade Brasileira de Genética, 1991.

RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. **Toxicol**, 39: 603-613, 2001.

REIFFERSCHIED, G., HEIL, J. Validation of SOS/*umu* test using results of 486 chemicals and comparison with the Ames test and carcinogenicity data. **Mutation Research**, 369: 129-145, 1996.

ROMERO-JIMÉNEZ, M., CAMPOS-SÁNCHEZ, J., ANALLA, M., MUÑOZ-SERRANO, A., ALONSO-MORAGA, A. Genotoxicity and anti-genotoxicity of some traditional medicinal herbs. **Mutation Research**, 585: 147-155, 2005.

ROVOZZO, G. C., BURKE, C. N. **A manual of basic virological techniques**. New Jersey: Prentice Hall, 1973, 159p.

SALVADORI, D. M. F., RIBEIRO, L. R., FENECH, M. Teste do micronúcleo em células humanas in vitro. In: RIBEIRO LR, SALVADORI DMF, MARQUES EK (Ed.). **Mutagênese Ambiental**. 1ª ed. Canoas: Editora da ULBRA, 2003, p. 201-219.

SARASIN, A. An overview of the mechanisms of mutagens and carcinogens. **Mutation Research**, 544: 99-106, 2003.

**SBMCTA**, série documentos. Orientações básicas de execução de testes de mutagenicidade para proteção da saúde humana e do meio ambiente. Sociedade Brasileira de Mutagênese, Carcinogênese e Teratogênese Ambiental, 2004.  
<<http://www.sbmcta.org.br/index.php?arq=doc01>>.

SCHMID, W. The micronucleus test. **Mutation Research**, 31: 9-15, 1975.

SCHMID, W., ARAKAKI, D. T., BRESLAU, N. A., CULBERTSON, J. C. Chemical mutagenesis. The chinese hamster bone marrow as an in vivo test system, I. Cytogenetic results on basic aspects of the methodology, obtained with alkylating agents. **Humangenetik**, II: 103-118, 1971.

SETZER, W. N., SHEN, X., BATES, R. B., BURNS, J. R., McCLURE, K. J., ZHANG, P., MORIARITY, D. M., LAWTON, R. O. A phytochemical investigation of *Alchornea latifolia*. **Fitoterapia**, 71:195-198, 2000.

SHAN, B., CAI, Y. Z., BROOKS, J. D., CORKE, H. Antibacterial properties of *Polygonum cuspidatum* roots and their major bioactive constituents. **Food Chemistry**, 109: 530-537, 2008.

SHIEH, D., CHEN, Y., YEN, M., CHIANG, L., LIN, C. Emodin-induced apoptosis through p53 - dependent pathway in human hepatoma cells. **Life Sciences**, 74: 2279-2290, 2004.

SIMÕES, C. M., SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C. M. O., SCHENKEL, E. P., GOSMANN, G., MELLO, J. C. P., MENTZ, L. A., PETROVICK, P. R. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5ª ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2004, p. 657-684.

SPEIT, G., HARTMANN, A. The Comet Assay (Single-Cell Gel Test), A Sensitive Genotoxicity Test for the Detection of DNA Damage and Repair. In: HENDERSON, D. S. **Methods in Molecular Biology: DNA Repair Protocols - Eukaryotic Systems**. Totowa: Humana Press, v. 113, p. 203-211, 1999.

SPEIT, G., TRENZ, K., SCHÜTZ, P., ROTHFUB, A., MERK, O. The influence of temperature during alkaline treatment and electrophoresis on results obtained with the comet assay. **Toxicology Letters**, 110: 73-78, 1999.

SUN, M., SAKAKIBARA, H., ASHIDA, H., DANNO, G., KANAZAWA, K. Cytochrome P4501A1-inhibitory action of antimutagenic anthraquinones in medicinal plants and the structure-activity relationship. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, 64: 1373-1378, 2000.

TANAKA, H., MOROOKA, N., HARAICAWA, K., UENO, Y. Metabolic activation of emodin in the reconstituted cytochrome P-450 system of the hepatic microsomes of rats. **Mutation Research**, 176(2):165-70, 1987.

TICE, R. R., AGURELL, E., ANDERSON, D., BURLINSON, B., HARTMANN, A., KOBAYASHI, H., MIYAMAE, Y., ROJAS, E., RYU, J. C., SASAKI, Y. F. Single Cell Gel/Comet assay: Guideline for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, 35: 206-221, 2000.

TIKKANEN, L., MATSUSHIMA, T., NATORI, S. Mutagenicity of anthraquinones in the Salmonella preincubation test. **Mutation Research**, 116(3-4): 297-304, 1983.

UMBUZEIRO, G. A., FREEMAN, H., WARREN, S. H., KUMMROWF, CLAXTON, L. D. Mutagenicity evaluation of the commercial product CI Disperse Blue 291 using different protocols of the Salmonella assay. **Food and Chemical Toxicology**, 43: 49 -56, 2005.

UMBUZEIRO, G. A., VARGAS, V. M. F. Teste de mutagenicidade com *Salmonella typhimurium* (Teste de Ames) como indicador de carcinogenicidade em potencial para mamíferos. In: RIBEIRO, L. R., SALVADORI, D. M. F., MARQUES, E.K. (Ed.). **Mutagênese Ambiental**. 1ª ed. Canoas: Editora da ULBRA, 2003, pp. 81-112.

VALENTE, C., PEDRO, M., DUARTE, A., NASCIMENTO, M. S. J., ABREU, P. M., FERREIRA, M. J. U. Bioactive diterpenoids, a new jatrophone and two *ent*-abietanes, and other constituents from *Euphorbia pubescens*. **Journal of Natural Products**, 67: 902-904, 2004.

VALENTIN, I., LHUGUENOT, J. C., CHAGNON, M. C. Uridine uptake inhibition as a cytotoxicity test for human hepatoma cell line (HepG2 cells): comparison with the neutral red assay. **Biochimica et Biophysica Acta**, 794: 373-380, 2000.

VALENTIN-SEVERIN, I., LE HEGARAT, L., LHUGUENOT, J. C., LE BON, A. M., CHAGNON, M. C. Use of HepG2 cell line for direct or indirect mutagens screening: comparative investigation between comet and micronucleus assays. **Mutation Research**, 536:79-90, 2003.

VELLONEN, K. S., HONKAKOSKI, P., URTTI, A. Substrates and inhibitors of efflux proteins interfere with the MTT assay in cells and may lead to underestimation of drug toxicity. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, 23: 181-188, 2004.

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

WANG, C., WU, X., CHEN, M., DUAN, W., SUN, L., YAN, M., ZHANG, L. Emodin induces apoptosis through caspase 3-dependent pathway in HK-2 cells. **Toxicology**, 231:120-128, 2007.

WASSON, G. R., MCKELVEY-MARTIN, V. J., DOWNES, C. S. The use of comet assay in the study of human nutrition and cancer. **Mutagenesis**, 23(3): 153-162, 2008.

WESTENDORF, J., MARQUARDT, H., POGINSKY, B., DOMINIAK, M., SCHMIDT, J., MARQUARDT, H. Genotoxicity of naturally occurring hydroxyanthraquinones. **Mutation Research**, 240 (1): 1-12, 1990.

WHO – WORLD HEALTH ORGANISATION. General guidelines for methodologies on research and evaluation of traditional medicine, 2000.

WHO – WORLD HEALTH ORGANISATION. Traditional Medicine Strategy 2002-2005., 2002. Disponível em: <[http://whqlibdoc.who.int/hq/2002/WHO\\_EDM\\_TRM\\_2002.1.pdf](http://whqlibdoc.who.int/hq/2002/WHO_EDM_TRM_2002.1.pdf)>. Acesso em: 10 jan 2008.

WILKENING, S., STHAL, F., BADER, A. Comparison of primary hepatocytes and hepatoma cell line HepG2 with regard to their biotransformation properties. **Drug Metabolism and Disposition**, 31(8): 1035-1041, 2003.

WINKER, M., SHIMMER, O. Modes of action of defensive secondary metabolites. In: WINK, M. **Functions of plant secondary metabolites and their exploitation in biotechnology**. 1st edition. England: Sheffield Academic Press, 2000, p. 17-133.

WITTE, I., PLAPPERT, U., WALL, H., HARTMANN, A. Genetic Toxicity Assessment: Employing the best science for human evaluation Part III: The Comet Assay as an alternative to in vitro clastogenicity tests for early drug candidate selection. **Toxicological Sciences**, 97(1): 21-26, 2007.

WOGAN, G. N., HECHT; S. S., FELTON, J. S., CONNEY, A. H., LOEB, L. A. Environmental and chemical carcinogenesis. **Seminars in Cancer Biology**, v. 14, p. 473-486, 2004.

WYLLIE, A. H. Apoptosis, cell death and cell proliferation. 3rd ed. Roche Applied Science manual, 2008.

YANG, J., LI, H., CHEN, Y., WANG, X., SHI, G., HU, Q., KANG, X., LU, Y., TANG, X., GUO, Q., YI, J. Anthraquinones sensitize tumor cells to arsenic cytotoxicity in vitro and in vivo via reactive oxygen species-mediated dual regulation of apoptosis. **Free Radical Biology & Medicine** 37:2027-2041, 2004.

ZEIGER, E. Genetic toxicity tests for predicting carcinogenicity. In: CHOY WN (Ed). **Genetic Toxicology and Cancer Risk Assessment**. 1st edition. New York: Marcel Dekker, 2001, p. 29-46.

ZEIGER, E. What is needed for an acceptable antimutagenicity manuscript? **Mutation Research**, 626: 1-3, 2007.

ZHOU S, KOH H, GAO Y, GONG Z, LEE EJD (2004). Herbal bioactivation: The good, the bad and the ugly. **Life Sciences**, 74: 935-968.

ZONG-YAN, F., JIN-XIANG, H., HAI-YAN, H. Effects of emodin on gene expression profile in small cell lung cancer NCI-H446. **Chinese Medical Journal**, 120: 1710-1715, 2007.

**ANEXOS**

**Tabela 01** – Valores médios  $\pm$  desvio padrão da absorbância obtida no teste de citotoxicidade MTT, após 24 horas de tratamento.

Parâmetros	Absorbância	
	Média $\pm$ Desvio Padrão	
	Extrato Raiz	Extrato Folha
Controle	0,4264 $\pm$ 0,092	0,5114 $\pm$ 0,080
0,2 $\mu\text{g/mL}$	0,474 $\pm$ 0,0849	0,506 $\pm$ 0,096
2,0 $\mu\text{g/mL}$	0,505 $\pm$ 0,0909	0,5986 $\pm$ 0,08
20 $\mu\text{g/mL}$	0,5151 $\pm$ 0,131	0,5704 $\pm$ 0,076
200 $\mu\text{g/mL}$	0,2163 $\pm$ 0,022***	0,5016 $\pm$ 0,049
2000 $\mu\text{g/mL}$	0,2783 $\pm$ 0,050**	0,2247 $\pm$ 0,046***

ANOVA seguida de Teste de Tukey;  $\alpha = 0,05$

\*\* Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle negativo ( $p < 0,01$ )

\*\*\* Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle negativo ( $p < 0,001$ )

**Tabela 02** – Valores médios  $\pm$  desvio padrão da absorbância obtida no teste de citotoxicidade MTT, após 48 horas de tratamento.

Parâmetros	Absorbância	
	Média $\pm$ Desvio Padrão	
	Extrato Raiz	Extrato Folha
Controle	1,274 $\pm$ 0,143	1,137 $\pm$ 0,582
0,2 $\mu\text{g/mL}$	1,229 $\pm$ 0,213	1,289 $\pm$ 0,532
2,0 $\mu\text{g/mL}$	1,458 $\pm$ 0,127	1,081 $\pm$ 0,44
20 $\mu\text{g/mL}$	1,55 $\pm$ 0,261	1,347 $\pm$ 0,585
200 $\mu\text{g/mL}$	0,464 $\pm$ 0,072***	1,305 $\pm$ 0,372
2000 $\mu\text{g/mL}$	0,179 $\pm$ 0,015***	0,336 $\pm$ 0,165**

ANOVA seguida de Teste de Tukey;  $\alpha = 0,05$

\* Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle negativo ( $p < 0,05$ )

\*\* Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle negativo ( $p < 0,01$ )

\*\*\* Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle negativo ( $p < 0,001$ )

**Tabela 03** – Valores médios  $\pm$  desvio padrão da absorbância obtida no teste de citotoxicidade MTT, após 72 horas de tratamento.

Parâmetros	Absorbância	
	Média $\pm$ Desvio Padrão	
	Extrato Raiz	Extrato Folha
Controle	1,471 $\pm$ 0,297	1,723 $\pm$ 0,171
0,2 $\mu\text{g/mL}$	1,246 $\pm$ 0,145	1,706 $\pm$ 0,153
2,0 $\mu\text{g/mL}$	1,249 $\pm$ 0,183	1,558 $\pm$ 0,371
20 $\mu\text{g/mL}$	1,608 $\pm$ 0,360	1,715 $\pm$ 0,371
200 $\mu\text{g/mL}$	0,991 $\pm$ 0,264***	1,390 $\pm$ 0,232
2000 $\mu\text{g/mL}$	0,219 $\pm$ 0,038***	0,264 $\pm$ 0,095***

ANOVA seguida de Teste de Tukey;  $\alpha = 0,05$

\*\* Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle negativo ( $p < 0,01$ )

\*\*\* Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle negativo ( $p < 0,001$ )

**Tabela 04** – Frequência de células com dano, distribuição das classes de danos e escore referente ao teste de genotoxicidade *in vitro* (Média ± Desvio Padrão).

Tratamento	Total de células com dano	Classes do Cometa				Escore
		0	I	II	III	
Controle	6,33 ± 3,51	93,66 ± 3,51	5,66 ± 3,055	0,66 ± 0,5774	0,00 ± 0,00	6,33 ± 3,51
C. positivo	87,66 ± 2,08	12,33 ± 2,08	74,66 ± 8,08	13,0 ± 8,88	0,00 ± 0,00	100,66 ± 10,06
ER1 – 0,2 µg/mL	9,0 ± 2,64	91,00 ± 2,64	9,00 ± 2,646	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	9,0 ± 2,64
ER2 – 2,0 µg/mL	22,00 ± 11,26	78,00 ± 11,26	19,33 ± 7,572	2,66 ± 3,786	0,00 ± 0,00	24,66 ± 15,01
ER3 – 20 µg/mL	28,33 ± 6,11	71,66 ± 6,11	28,33 ± 6,110	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	28,33 ± 6,11
EF1 – 0,2 µg/mL	12,0 ± 2,64	88,00 ± 2,64	12,00 ± 2,646	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	12,0 ± 3,34
EF2 – 2,0 µg/mL	21,00 ± 9,16	79,00 ± 9,16	20,00 ± 8,544	1,00 ± 1,00	0,00 ± 0,00	21,66 ± 10,26
EF3 – 20 µg/mL	22,0 ± 8,18	78,00 ± 8,18	22,00 ± 8,185	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	22,0 ± 8,18

C. positivo: Benzo[a]pireno – 25 µg/mL

**Tabela 05** – Total de células com dano e escore referente ao teste de genotoxicidade *in vitro* e os respectivos níveis de significância (p) obtidos no teste-t.

Tratamento	Total de células com dano	p	Escore	p
Controle	6,33 ± 3,51	-	6,33 ± 3,51	-
C. positivo	87,66 ± 2,08	< 0,0001	100,66 ± 10,06	0,0001
ER1 – 0,2 µg/mL	9,0 ± 2,64	0,3528	9,0 ± 2,64	0,3528
ER2 – 2,0 µg/mL	22,00 ± 11,26	0,0830	24,66 ± 15,01	0,1085
ER3 – 20 µg/mL	28,33 ± 6,11	0,0057	28,33 ± 6,11	0,0057
EF1 – 0,2 µg/mL	12,0 ± 2,64	0,0894	12,0 ± 3,34	0,0894
EF2 – 2,0 µg/mL	21,00 ± 9,16	0,0608	21,66 ± 10,26	0,0706
EF3 – 20 µg/mL	22,0 ± 8,18	0,0382	22,0 ± 8,18	0,0382

C. positivo: Benzo[a]pireno – 25 µg/mL

**Tabela 06** – Avaliação da mutagenicidade dos extratos de *C. mollis* em células HTC. Total de células binucleadas analisadas, total de células binucleadas com micronúcleo, valor médio encontrado de células micronucleadas, valor médio do Índice de Divisão Nuclear (IDN) e respectivo nível de significância (p) obtido no Teste-t.

Tratamento	Total de céls. analisadas	Total céls. c/ MN	X ± S	p	IDN (X ± S)	p
Controle	3000	17	5,6 ± 0,57	-	1,764 ± 0,070	-
C. positivo	3000	46	15,33 ± 3,51	0,0093	1,712 ± 0,012	0,2794
ER1- 0.2µg/mL	3000	08	2,66 ± 0,57	0,0031	1,794 ± 0,142	0,7593
ER2- 2.0µg/mL	3000	16	5,33 ± 1,52	0,7415	1,762 ± 0,117	0,9810
ER3- 20.0µg/mL	3000	24	8,0 ± 1,73	0,0913	1,698 ± 0,130	0,4805
EF1- 0.2µg/mL	3000	09	3,0 ± 1,0	0,0161	1,829 ± 0,145	0,5214
EF2- 2.0µg/mL	3000	13	4,3 ± 2,08	0,3453	1,792 ± 0,155	0,7907
EF3- 20.0µg/mL	3000	25	8,33 ± 3,78	0,2943	1,757 ± 0,148	0,6923

C. positivo: Benzo[a]pireno – 25 µg/mL

**Tabela 07** – Avaliação da indução de apoptose após tratamento das células HTC por 24 horas com os extratos de *C. mollis*. Número total de células analisadas, número de células apoptóticas encontradas, média ± desvio padrão de células apoptóticas e frequência de células apoptóticas.

Tratamento	Total de céls. analisadas	Total céls. Apoptóticas	X ± S	p*	fi (%)**
Controle	1500	3	1,0 ± 1,0	-	0,2
C. positivo	1500	37	12,33 ± 4,93	0,0175	2,46
ER1- 0,2µg/mL	1500	4	1,33 ± 1,15	0,7247	0,26
ER2- 2,0µg/mL	1500	10	3,33 ± 2,51	0,2099	0,66
ER3- 20µg/mL	1500	31	10,33 ± 5,85	0,0530	2,06
ER4- 200µg/mL	1500	78	26,0 ± 9,53	0,0107	5,2
EF1- 0,2µg/mL	1500	8	2,66 ± 1,52	0,1890	0,53
EF2- 2,0µg/mL	1500	15	5,0 ± 3,6	0,1377	1,0
EF3- 20µg/mL	1500	22	7,33 ± 4,0	0,0579	1,46
EF4-200µg/mL	1500	33	11,0 ± 2,64	0,0036	2,2

\* Teste-t de Student em relação ao controle negativo.

C. positivo: Cisplatina 20µM

\*\* (A/T x 100), onde A = total de células apoptóticas; T = total de células analisadas

**Tabela 08** – Frequência de células com dano, distribuição das classes de danos e escore referente ao teste de genotoxicidade *in vivo* (Média ± Desvio Padrão).

Tratamento	Total de células com dano	Classes do Cometa				Escore
		0	I	II	III	
Controle	15,4 ± 3,97	84,6 ± 3,97	15,4 ± 3,97	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	15,4 ± 3,97
C. positivo	63,8 ± 6,97	36,2 ± 6,97	62,6 ± 5,85	1,2 ± 1,64	0,00 ± 0,00	65,0 ± 8,27
ER1 (6,6x10 <sup>-3</sup> mg/Kg)	46,6 ± 3,78	53,4 ± 3,78	46,6 ± 3,78	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	46,6 ± 3,78
ER2 (6,6x10 <sup>-2</sup> mg/Kg)	33,0 ± 6,04	67,00 ± 6,04	33,00 ± 6,04	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	33,0 ± 6,04
ER3 (6,6x10 <sup>-1</sup> mg/Kg)	43,8 ± 10,42	56,2 ± 10,42	42,2 ± 9,2	1,6 ± 3,57	0,00 ± 0,00	45,4 ± 12,58
EF1 (6,6x10 <sup>-3</sup> mg/Kg)	9,8 ± 5,58	90,2 ± 5,58	9,8 ± 5,58	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	9,8 ± 5,58
EF2 (6,6x10 <sup>-2</sup> mg/Kg)	25,6 ± 5,54	74,4 ± 5,54	25,6 ± 5,54	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	25,6 ± 5,54
EF3 (6,6x10 <sup>-1</sup> mg/Kg)	43,6 ± 20,1	56,4 ± 20,1	40,2 ± 16,19	3,00 ± 4,79	0,4 ± 0,89	47,4 ± 25,33

C. positivo: Ciclofosfamida 50 mg/Kg

**Tabela 09** – Total de células com dano e escore referente ao teste de genotoxicidade *in vivo* e os respectivos níveis de significância (p) obtidos na análise estatística (Kruskall-Wallis seguida de teste de Dunn).

Tratamento	Total de células com dano	p	Escore	p
Controle	15,4 ± 3,97	-	15,4 ± 3,97	-
C. positivo	63,8 ± 6,97	<0,01	65,0 ± 8,27	<0,01
ER1 (6,6x10 <sup>-3</sup> mg/Kg)	46,6 ± 3,78	>0,05	46,6 ± 3,78	>0,05
ER2 (6,6x10 <sup>-2</sup> mg/Kg)	33,0 ± 6,04	>0,05	33,0 ± 6,04	>0,05
ER3 (6,6x10 <sup>-1</sup> mg/Kg)	43,8 ± 10,42	>0,05	45,4 ± 12,58	>0,05
EF1 (6,6x10 <sup>-3</sup> mg/Kg)	9,8 ± 5,58	>0,05	9,8 ± 5,58	>0,05
EF2 (6,6x10 <sup>-2</sup> mg/Kg)	25,6 ± 5,54	>0,05	25,6 ± 5,54	>0,05
EF3 (6,6x10 <sup>-1</sup> mg/Kg)	43,6 ± 20,1	>0,05	47,4 ± 25,33	>0,05

C. positivo: Ciclofosfamida 50 mg/Kg