



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

RONALDO DE JESUS COSTA

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO POTENCIAL MUTAGÊNICO DE  
*BIDENS PILOSA* LINÉ (PICÃO – PRETO) E DE *MIKANIA  
GLOMERATA* SPRENGEL (GUACO) POR MEIO DE  
ENSAIO DO COMETA E TESTE  
DE MICRONÚCLEO**

---

Londrina  
2006

**RONALDO DE JESUS COSTA**

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO POTENCIAL MUTAGÊNICO DE  
*BIDENS PILOSA* LINÉ (PICÃO – PRETO) E DE *MIKANIA  
GLOMERATA* SPRENGEL (GUACO) POR MEIO DE  
ENSAIO DO COMETA E TESTE  
DE MICRONÚCLEO**

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

Orientadora: Profa. Dra. Berenice Quinzani Jordão

Londrina  
2006

**RONALDO DE JESUS COSTA**

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO POTENCIAL MUTAGÊNICO DE  
*BIDENS PILOSA* LINÉ (PICÃO – PRETO) E DE *MIKANIA  
GLOMERATA* SPRENGEL (GUACO) POR MEIO DE  
ENSAIO DO COMETA E TESTE  
DE MICRONÚCLEO**

**BANCA EXAMINADORA**

---

Berenice Quinzani Jordão (Orientadora)

---

Ilce Mara de Fylos Cólus

---

Verônica Elisa Pimenta Vicentini

Londrina, 26 de fevereiro de 2006.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora **Profa. Dra. Berenice Quinzani Jordão**, pela oportunidade oferecida.

Ao **Prof. Dr. Mário Sérgio Mantovani** pelas aulas, atenção prestada e auxílio durante a pesquisa, e à Prof.<sup>a</sup> Doutoranda Andréia Diniz, pela colaboração e pelo trabalho em conjunto.

Ao Programa de Mestrado em Genética e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Londrina pelas condições necessárias ao desenvolvimento do trabalho; aos professores do Programa pelos ensinamentos fornecidos, bem como aos membros da banca, Profa. Dra. Ilce Mara e Dra. Verônica, pela colaboração prestada.

Aos técnicos de laboratório Dário e Mellissa e à secretária Sueli, pela ajuda e orientação prestadas.

Aos colegas de laboratório, pela colaboração, em particular aos colegas **José Pedro Angeli, Marilanda Bellini e Rodrigo Juliano de Oliveira** pelos importantes socorros nos momentos de dúvidas.

À CAPES, pelo financiamento deste trabalho.

Aos colegas da farmácia, **Sr. Valdinei, Sr. Carlos Roberto** e à gerente **Irene Taque**, pela compreensão nos freqüentes atrasos e nos dias de sair um pouco mais cedo.

Agradeço, de forma especial, àqueles que contribuíram de forma diferencial para minha formação como pessoa:

- ao **Prof. Dr. Paulo Roberto Haidamus de Oliveira Bastos e Prof. Flávio Dantas** da UFMS, pelo companheirismo e orientação na busca pela essência da profissão farmacêutica; e
- ao Sensei **Rubens de Almeida**, pelo exemplo de força de vontade.

Agradeço muito aos **meus irmãos Ricardo e Rafael**, que sempre deram apoio, **a minha irmã Rosana**, por sempre atender aos prazos expirados para envio de documentos, **e agradeço principalmente a meus pais, Batista e Venina por terem se tornado uma motivação constante para sempre continuar o caminho.**

COSTA, Ronaldo J. **Avaliação *in vitro* do potencial mutagênico de *Bidens pilosa* Liné (picão-preto) e de *Mikania glomerata* Sprengel (guaco), por meio de ensaio do cometa e teste de micronúcleo.** 2006. 68f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2006.

## RESUMO

O consumo de *Bidens pilosa* Liné (picão-preto) e de *Mikania glomerata* Sprengel (guaco) na forma de chás ocorre com frequência na sociedade, principalmente em casos de icterícia e de afecções de vias aéreas superiores, respectivamente. Para verificar a possível capacidade destas duas plantas de induzir danos ao DNA, foram utilizados o ensaio do cometa (SCGE) e o teste de micronúcleo (MN) em células metabolizadoras de hepatoma de *Ratus norvegicus* (HTC), testando-se chás preparados na forma de infuso tanto para guaco (IM) quanto para picão-preto (IB). Testou-se também macerado de folhas de guaco em etanol 80% (MM80) e decocto de picão-preto (DB). Para a escolha das concentrações a serem testadas, considerou-se a dose de ingestão diária recomendada (IDR) para cada planta. As doses utilizadas de todas as soluções teste basearam-se em valores de 50, 100 e 200% da IDR. Também foi usada a dose de 400% da IDR no caso de MM80, para comparação de resultados. A quantificação de cumarina em IM e MM80 foi realizada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – UV - CLAE- UV. Os dados obtidos pelo teste do cometa demonstraram que ambas as plantas causaram genotoxicidade, na maioria dos tratamentos. Das soluções testadas em MN, somente IM40 (200% da IDR) induziu mutagenicidade. Os resultados indicaram danos ao DNA mais acentuados para as doses mais altas. Os resultados com o ensaio do cometa também sugerem diferença significativa na composição química entre as duas formas extrativas de guaco, diferença esta confirmada pela cromatografia. Contudo, os efeitos apresentados por IM e MM80 demonstraram não ter relação direta com a quantidade de cumarina. No caso do picão-preto, o decocto apresentou genotoxicidade menor do que a infusão, sugerindo também distinção na composição química das duas formas de chás desta planta, provavelmente causada pelo tempo prolongado de exposição à alta temperatura, durante o processo de decocção. As informações obtidas demonstraram que, mesmo possuindo diversas propriedades terapêuticas, tanto *M. glomerata* quanto *B. pilosa* não estão isentas de induzir efeitos adversos sobre o DNA, o que alerta para a necessidade de cuidados na utilização destas plantas como fitoterápicos. A relação dose utilizada/efeito observado sugere, por sua vez, que a ingestão de grandes quantidades de chás destas plantas pode tornar-se prejudicial ao material genético. A forma de preparo do fitoterápico também tem importância para este efeito. Assim, estudos adicionais se fazem necessários a fim de esclarecer sobre quais as condições de uso que oferecem a melhor relação benefício X risco à saúde da população.

**Palavras-chave:** Mutagenicidade. Célula HTC. *Mikania glomerata*. *Bidens pilosa*. Ensaio do cometa. Micronúcleo.

COSTA, Ronaldo J. **Evaluation *in vitro* of the mutagenic potential of *Bidens pilosa* Liné (“picão-preto”) and of *Mikania glomerata* Sprengel (“guaco”), by means of comet assay and micronucleus test.** 2006. 68p. Dissertation (Master Degree in Genetics and Molecular Biology) – State University of Londrina, Londrina, 2006.

## ABSTRACT

The consumption of *Bidens pilosa* Liné (“picão-preto”) and of *Mikania glomerata* Sprengel (“guaco”) in the form of teas occurs with frequency in the society, mainly in cases of jaundice and affections of superior respiratory ways, respectively. To verify the potential capacity of these two plants to induce damages to the DNA, the assay of the comet (SCGE) and the test of micronucleus (MN) had been used in hepatic metabolizing cells of *Ratus norvergicus* (HTC), testing teas prepared in the form of infusion of *Mikania glomerata* (IM) and *Bidens pilosa* (IB). It was also tested macerated of leaves of *Mikania glomerata* in ethanol 80% (MM80) and decoction of *Bidens pilosa* (DB). For the choice of the concentrations to be tested, it was considered the recommended daily ingestion dose (IDR) for each plant. The doses used of all the solutions test had been based on values of 50, 100 e 200% of the IDR. Also the dose of 400% of the IDR, in the MM80 case, was used for comparison of results. The coumarin quantification in IM and MM80 was carried through High Efficiency Liquid Chromatography - UV - CLAE-UV. The data obtained for the test of the comet had demonstrated that both the plants had caused genotoxicity, in the majority of the treatments. Over all solutions tested in MN, only IM40 (200% of the IDR) induced mutagenicity. The results indicated damages to the DNA more accentuated for the highest doses. The results with the comet assay also suggest significant difference in the chemical composition between the two extractive forms of *Mikania glomerata*, difference this confirmed by the chromatography. However, the effects presented by IM and MM80 demonstrated not to have direct relation with the amount of coumarin. In the case of *Bidens pilosa*, decoction presented lesser genotoxicity of that the infusion, also suggesting distinction in the chemical composition of both forms of teas of this plant, probably caused for the long time of exposition to high temperature during the decoction process. The gotten information demonstrate that, still that possessing diverse therapeutical properties, as much *M. glomerata* how much *B. pilosa* can be to induce adverse effects on the DNA, what alert for the necessity of cares in the use of these plants as phytoterapic agents. The relation used dose / observed effect suggests, in turn, that the ingestion of great amounts of teas of these plants can become harmful to the genetic material. The form of preparation of them also is important for this effect. Thus, supplementary studies are necessary in order to clarify on which conditions of use these plants could offer the best relation benefit X risk to the population health.

**Keywords:** Mutagenicity. HTC cells. *Mikania glomerata*. *Bidens pilosa*. Comet assay. Micronucleous.

## LISTA DE FIGURAS

### 1 Introdução

- 1.1 Figura 01** –Classes de cometa em núcleos de células HTC corados com brometo de etídio (2µg/mL). Aumento de 1000X.....17
- 1.2 Figura 02** –Representação esquemática de formação de micronúcleo. Células binucleadas coradas com corante de Rosenfeld em aumento de 400X .....20
- 1.3 Figura 03** –*Bidens pilosa* Liné (foto obtida de [www.plantamed.com.br](http://www.plantamed.com.br)) .....21
- 1.4 Figura 04** –Estrutura química da quercetina (U.S. department of health and human services, 1992) .....21
- 1.5 Figura 05** –Folhas de *Mikania glomerata* Sprengel (foto extraída de [www.plantamed.com.br](http://www.plantamed.com.br)) .....23
- 1.6 Figura 06** –Estrutura química da cumarina (US department of health and human service, 1993) .....24

### 2 Artigo

- 2.1 Figura 1** –Frequência média de células HTC com cometa obtida nos controles: tampão fosfato (PBS), metilmetanosulfonato (MMS) e etanol 80% (EtOH 80) e nos tratamentos: infuso de *M.glomerata* (IM), macerado de *M. glomerata* em etanol 80% (MM80), infuso de *B. pilosa* (IB) e decocto de *B. pilosa* (DB), em diferentes concentrações .....46
- 2.2 Figura 2** –Número médio de células HTC com cometa e respectivos escores médios obtidos nos controles: tampão fosfato (PBS), metilmetanosulfonato (MMS) e etanol 80% (EtOH80) e nos tratamentos: infuso de *M. glomerata* (IM), macerado de *M. glomerata* em etanol 80% (MM80), infuso de *B. pilosa* (IB) e decocto de *B. pilosa* (DB), em diferentes concentrações.....47

- 2.3 Figura 3** –Escore médio obtido nos controles: tampão fosfato (PBS), metilmetanosulfonato (MMS) e etanol 80% (EtOH 80) e nos tratamentos: infuso de *M.glomerata* (IM), macerado de *M. glomerata* em etanol 80% (MM80), infuso de *B. pilosa* (IB) e decocto de *B. pilosa* (DB), em diferentes concentrações.....48
- 2.4 Figura 4** –Número médio de células HTC com MN obtido nos controles: tampão fosfato (PBS), metilmetanosulfonato (MMS), etanol 80% (EtOH 80) e nos tratamentos: infuso de *M.glomerata* (IM), macerado de *M. glomerata* em etanol 80% (MM80), infuso de *B. pilosa* (IB) e decocto de *B. pilosa* (DB), em diferentes concentrações .....48
- 2.5 Figura 5** –Comparação entre as médias dos resultados obtidos no teste do cometa e no teste do micronúcleo para os controles: tampão fosfato (PBS) e metilmetanosulfonato (MMS) - e tratamentos: infuso de *M. glomerata* (IM), macerado de *M. glomerata* em etanol 80% (MM80), infuso de *B. pilosa* (IB) e decocto de *B. pilosa* (DB), aplicados em diferentes concentrações.....49
- 2.6 Figura 6** –Cromatogramas de infuso de *M. glomerata* (IM) e macerado de *M. glomerata* em etanol a 80% (MM80) obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência - UV (CLAE - UV) .....50

## LISTA DE TABELAS

### 1 Introdução

1.1 Tabela I – Componentes isolados de extratos de <i>Bidens pilosa</i> (LASTRA VALDES, 2001).....	22
--	----

### 2 Artigo

2.1 Tabela I – Médias de células com cometa e de células com micronúcleo obtidas nos tratamentos-controles e nos tratamentos com infuso e macerado etanólico de <i>Mikania glomerata</i> Sprengel e infuso e decocto de <i>Bidens pilosa</i> Liné, em células HTC .....	44
2.2 Tabela II – Concentração final de cumarina presente nas soluções usadas nos tratamentos <i>in vitro</i> com infuso e macerado em etanol 80% de <i>Mikania glomerata</i> Sprengel.....	45

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	12
1.1 MUTAGENICIDADE .....	13
1.2 TESTE DO COMETA .....	15
1.3 TESTE DO MICRONÚCLEO .....	17
1.4 PLANTAS UTILIZADAS.....	20
1.4.1 Picão Preto ( <i>Bidens pilosa</i> Liné) .....	20
1.4.2 Guaco ( <i>Mikania glomerata</i> Sprengel).....	23
1.4.3 Preparação dos extratos testados.....	25
1.4.3.1 Infusão.....	25
1.4.3.2 Decocção .....	25
1.4.3.3 Maceração.....	26
1.4.4 Quantificação de cumarina.....	26
<b>2 JUSTIFICATIVA</b> .....	27
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	28
3.1 OBJETIVOS GERAIS.....	28
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	28
<b>4 ARTIGO</b> .....	30
4.1 RESUMO .....	31
4.2 ABSTRACT.....	32
4.3 INTRODUÇÃO .....	33
4.4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
4.4.1 Cultura celular .....	35
4.4.2 Extratos testados.....	35
4.4.3 Quantificação de cumarina.....	37
4.4.4 Teste do cometa.....	38
4.4.5 Teste do micronúcleo (MN) .....	40
4.4.6 Análise estatística .....	40
4.4.7 Resultados .....	41
4.4.8 Discussão.....	51

4.4.9 Considerações finais .....	56
4.4.10 Referências bibliográficas .....	57
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>61</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Sabemos que o homem é exposto constantemente a agentes químicos através de alimentos e medicamentos, incluindo aqueles usados em medicina popular (OLIVEIRA et al., 2002).

A utilização de determinadas plantas no combate a doenças é um costume comum em nossa sociedade. Essa medicina alternativa, sobretudo no Brasil, é utilizada em larga escala, até porque essa prática remonta a períodos pré-descobrimto, onde os índios, grandes detentores do conhecimento do poder de cura pela natureza, faziam da floresta sua farmácia.

Além disso, há uma mescla com o conhecimento e plantas trazidos pelos colonizadores, tanto que, segundo Corrêa Junior et al. (1994) e Martins et al. (1995), a maior parte das espécies medicinais cultivadas no Brasil é de espécies exóticas, heliófitas e domesticadas em seus ecossistemas naturais.

O Brasil conta com a maior diversidade genética vegetal do mundo, com um total estimado entre 350.000 e 550.000 espécies, das quais apenas 55.000 estão catalogadas (SIMÕES et al., 2001).

Sabendo-se que cada espécie desconhecida pode vir a ser um medicamento importante (e conseqüentemente um produto lucrativo) não é nenhuma surpresa que o interesse de empresas farmacêuticas esteja voltado para essa área. Segundo Farias et al. (1994), várias empresas nacionais vêm empregando matéria-prima vegetal diretamente na elaboração de seus medicamentos.

Contudo, na utilização popular, seja como fitoterapia, seja na dieta, na maioria das vezes não se tem avaliação apropriada dessas plantas, comprovando a eficácia no tratamento ou possíveis efeitos adversos causados por elas (SILVEIRA; SÁ et al., 2003).

Desse ponto de vista, o estudo das plantas mais utilizadas pela população se faz de extrema importância para o tratamento ou mesmo prevenção de inúmeras doenças.

Dentre todas as possíveis patologias, um dos grandes focos da sociedade científica está na busca por substâncias que possam auxiliar no tratamento ou diminuir os riscos de desenvolver neoplasias, um dos grandes males

da sociedade moderna.

O descobrimento de produtos naturais que possam reduzir a taxa de mutações fatalmente diminuiria a incidência de câncer, pois o homem poderia aumentar a utilização de determinados agentes encontrados na dieta por exemplo, e procurar alimentos com potencial protetor (WATERS et al.,1990). Além disso, a possibilidade de evitar a utilização de plantas com potencial mutagênico seria de grande importância para a sociedade.

A genética toxicológica é uma das áreas da ciência que tem se dedicado à pesquisa das propriedades genotóxicas e mutagênicas de agentes aos quais os organismos estão expostos, fazendo uso de diversos ensaios que avaliam o dano que estes podem vir a causar ao DNA na presença ou ausência de sistemas de metabolização.

Dentre os ensaios realizados, os testes *in vitro* e *in vivo*, em plantas, insetos ou mamíferos são mais relevantes que os realizados em microrganismos, uma vez que a simplicidade estrutural desses últimos pode dificultar a extrapolação dos resultados para animais superiores.

Assim, a avaliação e o rastreamento de agentes com potencial mutagênico se fazem muito importantes nas condições atuais de vida humana. Ferrari (1991) já alertava, na época, ser cada vez mais urgente a utilização de métodos confiáveis capazes de detectar e medir o dano no DNA, bem como estabelecer possibilidades de proteção ou redução desses efeitos.

## **1.1 MUTAGENICIDADE**

O termo mutação refere-se a qualquer súbita mudança herdável no genótipo de um organismo (SIMMONS; SNUSTAD, 2001). Este conceito provém da observação de que muitas das alterações do DNA, ou mutações, passam despercebidas, uma vez que não implicam em mudanças detectáveis na atividade metabólica da célula ou do organismo ou, podem determinar a morte celular e, assim, também não são detectáveis. Quando não é letal para a própria célula, a mutação pode propagar-se pelo corpo em crescimento (mutação somática) ou transmitir-se às gerações seguintes (mutação germinativa) (RABELLO-GAY et al.,

1991). Tais alterações podem ser classificadas como microlesões (substituição de bases – transições e transversões) ou macrolesões (deleções, inserções ou translocações) (SIMMONS; SNUSTAD, 2001).

Os eventos mutacionais envolvendo células somáticas e reprodutoras podem levar a várias doenças, incluindo as doenças genéticas, a efeitos teratogênicos e a desordens herdáveis. Em particular, a relação entre mutações somáticas e o câncer é grande, já que alterações específicas no DNA e nos cromossomos estão intimamente relacionadas com os processos de carcinogênese (TROSKO, 1995). Segundo Ribeiro et al. (2003), uma célula, depois de passar por várias divisões, poderá acumular mutações que, se em grande número, poderão levar à perda do controle de sua divisão e, assim, determinar o aparecimento de neoplasias.

Os agentes causadores de danos no DNA podem ser classificados, segundo Brusick (1987) como S-dependentes (ex: mitomicina – C, metilmetanosulfonato), quando os danos causados são visualizados citogeneticamente somente após a fase de síntese do DNA do ciclo celular e como S-independentes (ex. bleomicina), no caso dos danos serem visíveis independentemente da fase de síntese. Além disso, ressalta também que há substâncias que atuam de maneira direta, sem necessidade de metabolização prévia pelo organismo (ex. mitomicina-C, metilmetanosulfonato) e substâncias que só atuam como danificantes de DNA após metabolização (ex. ciclofosfamida e 2 amino antraceno).

Ressalta-se também que o mesmo agente mutagênico pode produzir espectro mutagênico diferente em organismos também diferentes (GATEHOUSE, 1990). Para uma avaliação do espectro toxicológico de compostos químicos e medicamentos, são utilizados, rotineiramente, testes de toxicidade genética. Tal avaliação não é uma medida direta de carcinogenicidade, mas é usada como um indicador para o câncer, em função do acúmulo de dados que sugerem que a mutagenicidade é um prognóstico razoável para a carcinogenicidade (RIBEIRO et al., 2003).

Por outro lado, muitas substâncias endógenas, usualmente obtidas em alimentos ou sintetizadas pelas células, possuem alguma atividade inibitória contra elementos mutagênicos ambientais naturais ou artificiais que, muitas vezes, induzem aumento de freqüência de oncogênese. (ODIN, 1997).

Tendo em vista que os agentes mutagênicos estão direta ou indiretamente ligados a carcinogênese (TRICHOPOULOU et al., 1995), a possibilidade de inativá-los ou inibir sua síntese através de substâncias de fácil acesso à população abre um leque muito grande de possibilidades no que se refere à redução do número de casos de neoplasias, na diminuição do tempo ou mesmo no aumento da eficácia do tratamento das pessoas acometidas com esse tipo de patologia.

## 1.2 TESTE DO COMETA

O potencial mutagênico de xenobióticos pode se avaliado através de ensaios *in vitro* desde que obedecem a critérios básicos como: sensibilidade para revelar com facilidade e precisão estatística mesmo um pequeno defeito mutagênico; reprodutibilidade e capacidade para avaliar eventos genéticos que possam estar diretamente relacionados ao homem, fornecendo uma estimativa de risco ou nível de segurança para a população exposta (RABELLO- GAY et al., 1991).

O teste do cometa, também conhecido como eletroforese de gel de células individuais (*single cell gel electrophoresis* – SCGE) ou eletroforese de microgel (MGE), por ter características desejáveis para qualquer experimento - baixo custo, confiabilidade, sensibilidade e simplicidade de realizar - foi introduzido pela primeira vez por Östling e Johanson em 1984, como uma técnica para a visualização direta de danos no DNA em células individuais sob condições neutras de eletroforese (FAIRBAIN; O'NEIL., 1996).

Esse teste em condições de pH neutro detecta somente a presença de quebras de cadeia dupla no DNA, sendo, portanto, limitado para estudos que envolvem radiação e compostos químicos radiomiméticos. Assim sendo, o teste em pH alcalino oferece maior sensibilidade para detectar danos no material genético (TICE, 1995), pois consegue detectar quebras de fitas simples de DNA em virtude da abertura das fitas duplas neste pH.

As células com danos no DNA apresentam uma migração de DNA nuclear, em direção ao ânodo, produzindo imagens que se assemelham a de um cometa, de onde foi originado o nome do ensaio. Sob condições alcalinas, as

quebras de fitas simples e os sítios álcali-lábeis tornam-se visíveis, onde a quantidade de migração do DNA, identificada por um rastro ou cauda (daí o nome do teste), indica a quantidade de DNA danificado na célula (SINGH et al., 1988).

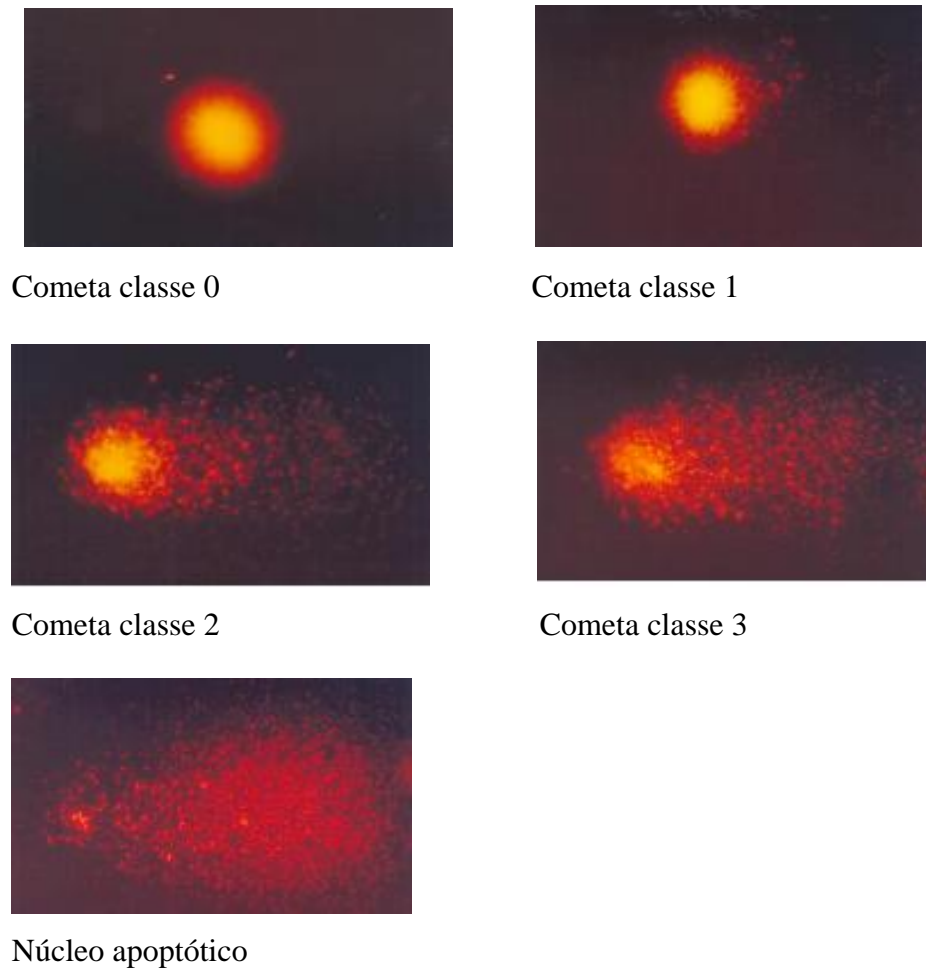
A migração é quantificada pela coloração com um corante fluorescente como o brometo de etídio e medida pela intensidade de fluorescência através de um microscópio de fluorescência.

Os cometas gerados pela técnica podem ser então analisados visualmente (KOBAYASHI, 1995). Desta forma, conforme mostra a figura 1, as células poderão ser classificadas em:

- classe 0 – com núcleos não danificados e que não apresentam cauda;
- classe 1 – com núcleos com cauda menor que o diâmetro do núcleo;
- classe 2 – núcleos com cauda de tamanho entre 1 e 2 vezes o diâmetro do núcleo;
- classe 3 – núcleos com cauda que possui mais de 2 vezes o tamanho do núcleo.

Núcleos de células apoptóticas, que se apresentam totalmente fragmentados, geralmente não são contabilizados (SPEIT et al., 1996).

Embora o teste seja amplamente aplicado, as técnicas de isolamento celular e as condições do experimento nas quais os testes são conduzidos, variam consideravelmente. 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 (LMP), a composição da solução de lise e tempo de lise, o tempo de desnaturação alcalina do DNA. Também são fatores que interferem nos resultados dos testes: composição e temperatura do tampão de eletroforese e as condições de corrida, coloração do DNA, entre outros (OLIVE et al., 1992; SPEIT et al., 1996).



**Figura 01** – Classes de cometa em núcleos de células HTC corados com brometo de etídio (2 $\mu$ g/mL). Aumento de 1000X

### 1.3 TESTE DO MICRONÚCLEO

Tratando-se de um teste que verifica a presença de pequena massa nuclear delimitada fora do núcleo da célula, o teste do micronúcleo (MN), criado por Matter e Schmid (1971) em células de medula óssea de camundongos, teve sua versão *in vitro* introduzida por Heddle em 1976.

Por tratar-se de um teste simples para avaliar danos citogenéticos, este ensaio evoluiu rapidamente, sofrendo contínuas inovações (RIBEIRO et al., 2003).

O MN se forma na telófase da mitose ou meiose, quando o envoltório nuclear é reconstituído ao redor dos cromossomos das células filhas.

Micronúcleos são resultantes de fragmentos de cromossomos (originados de quebra cromatídica ou isocromatídica – efeito clastogênico) que se perderam do núcleo principal, ou são originados por disfunções no fuso mitótico – efeito aneugênico (RABELLO-GAY et al., 1991; MERSH et al., 1996; FENECH, 2000; KIRSCH-VOLDERS; FENECH, 2001), provavelmente pela falta, defeito nos centrômeros ou por algum mecanismo falho que permite aos cromossomos a distribuição incorreta após a anáfase (FENECH, 2000).

O tamanho do micronúcleo permite inferir sobre o mecanismo que o originou. Grandes micronúcleos conteriam cromossomos inteiros, em decorrência de falha no fuso mitótico, enquanto micronúcleos menores poderiam se originar a partir de fragmentos de cromossomos (TUCKER; PRESTON, 1996).

Deve-se ressaltar que micronúcleos são expressos somente após um ciclo de divisão celular, sendo seu número dependente da proporção de células que está se dividindo. Desta forma, a comparação da frequência de micronúcleos entre populações de células em divisão só seria segura quando a cinética de divisão nuclear, após o dano ao DNA, fosse idêntica.

Pensando nisso, Fenech e Moley descreveram, em 1985, a versão do ensaio utilizando células binucleadas (MNCB), obtidas aplicando-se o bloqueio de citocinese, que permite identificar células que tenham passado por um ciclo de mitose após o tratamento (Figura 02). Isso possibilita identificar os micronúcleos gerados pela substância teste (aqueles em células binucleadas, pois obrigatoriamente passaram por um ciclo celular) e os ocasionados antes do tratamento (MN em células mononucleadas).

Esta variação é uma das metodologias mais utilizadas atualmente, empregando-se citocalasina-B (cyt-B) como inibidor de citocinese. A cyt-B é extraída do fungo *Helminthosporium dermatoidium*, tratando-se de um inibidor da polimerização dos microfilamentos de actina na placa equatorial formada no final da telófase e, conseqüentemente provoca ausência de citocinese (FENECH, 1997).

A utilização de bloqueador de citocinese oferece, contudo, algumas desvantagens, de acordo com Ribeiro et al. (2003):

- torna o teste efetivo somente para populações de células em divisão;
- não detecta não-disjunção meiótica;
- não detecta rearranjos cromossômicos;
- não possibilita o conhecimento do tipo de aberração que originou o

MN;

- a cyt-B pode interferir na detecção de compostos que também inibem a citocinese ou a polimerização dos microfilamentos.

É importante ressaltar que Phelps et al. (2002) e Garriot et al. (2002) comprovaram que a cyt-B não induz formação de MN, além de sugerir que sua utilização gera resultados mais confiáveis, pois garante que as células estavam em divisão durante o tratamento testado.

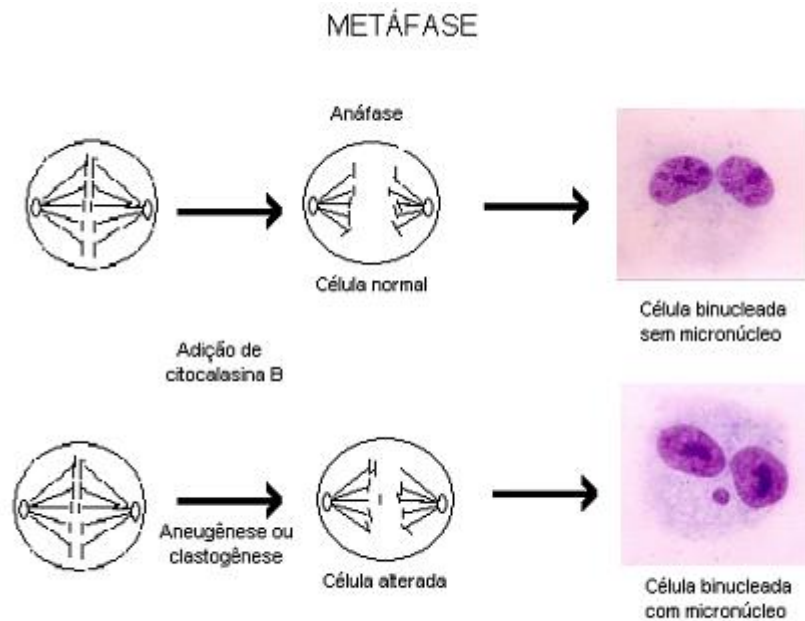
Durante a análise, as células binucleadas observadas devem obedecer alguns critérios (FENECH, 1997):

- núcleos devem apresentar delimitação nuclear intacta e estar situados no mesmo limite citoplasmático;
- núcleos devem apresentar tamanhos semelhantes, coloração padrão e de mesma intensidade;
- os dois núcleos principais podem estar ligados por uma ponte nucleoplasmática, desde que a largura não seja maior que  $\frac{1}{4}$  do diâmetro nuclear maior;
- os núcleos principais podem estar próximos, mas não devem estar sobrepostos, e os limites nucleares devem ser distinguíveis;
- o limite citoplasmático da célula binucleada deve estar intacto, e ser distinguível do limite citoplasmático das células adjacentes.

Os micronúcleos, por sua vez, devem apresentar as seguintes características, segundo Ferrari (1991), Titenko-Holland et al. (1997) e Fenech (2000):

- forma arredondada ou ovalada;
- cor e textura semelhantes às do núcleo principal;
- estar no mesmo plano e não estar ligado ao núcleo principal;
- tamanho entre  $\frac{1}{16}$  e  $\frac{1}{3}$  do tamanho do núcleo principal;
- não ser birrefringente.

Com relação ao número de células analisadas, Garriot et al. (2002) sugerem ser necessária a contagem de 2000 células binucleadas por tratamento, devido à possibilidade de distribuição não uniforme sobre a lâmina.



**Figura 02** – Representação esquemática de formação de micronúcleo. Células binucleadas coradas com corante de Rosenfeld em aumento de 400X

## 1.4 PLANTAS UTILIZADAS

### 1.4.1 Picão Preto (*Bidens pilosa* Liné)

O picão – preto (*Bidens pilosa* L.), erva medicinal da família Asteraceae, possui altura entre 30-100cm, com flores amarelas (ABAJO et al., 2004), conforme representada na Figura 03. Esta planta tem ampla dispersão nos trópicos e sub-trópicos, desde o nível do mar até cerca de 3000m de altitude (BALLARD, 1986). Por onde ocorre ela é adotada como fitoterápico, sendo preferido o uso das folhas (VASQUES et al., 1986), principalmente na solução de problemas hepáticos (hepatite e icterícia), além de laringites, dores de cabeça e desordens digestivas (ABAJO et al., 2004). Contudo, na medicina popular, a planta é utilizada inteira, exceto as raízes.

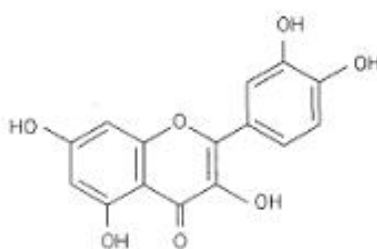
Por tratar-se de uma planta amplamente utilizada e conhecida,

inúmeros estudos químicos já foram realizados (CHANG-JUNG et al., 2001), destacando-se aqueles sobre atividades antioxidantes (KUSANO et al., 2003). Entre estes estudos incluem-se os que realizaram isolamento de componentes principais a partir de extratos, conforme relacionados na Tabela I.



**Figura 03** – *Bidens pilosa* Liné (foto obtida de [www.plantamed.com.br](http://www.plantamed.com.br)).

A principal substância química encontrada é um composto fenólico conhecido como quercetina (HOFFMANN; HÖLZL, 1989), muito bem estudada, cuja estrutura é apresentada na Figura 04:



**Figura 04** - Estrutura química da quercetina (U.S. department of health and human services, 1992).

Compostos polifenólicos têm demonstrado atividade antiinflamatória e antioxidante em modelos biológicos (RICE-EVANS et al., 1996). A própria quercetina, em virtude de sua capacidade antioxidante, demonstrou

anticarcinogenicidade em estudos animais.

*In vitro*, promoveu proteção ao DNA de linfócitos humanos em tratamento com peróxido de hidrogênio através do teste do cometa (DUTHIE et al., 1997). Contudo, *Bidens pilosa* possui diversas outras substâncias já definidas quimicamente (ABAJO et al., 2004; YI-MING et al., 2004), mas com efeitos ainda não relatados.

Oliveira et al. (2004) confirmaram propriedade antimalárica *in vitro* do extrato etanólico, por possuir atividade contra *Plasmodium falciparum*, sendo esta atividade relacionada à presença de poliacetileno e flavonóides. Efeitos hipotensivos também foram confirmados em ratos por Dimo et al. (2003), utilizando extratos de folhas. Alvarez et al. (1999) comprovaram atividade gástrica anti- secretória do extrato etanólico.

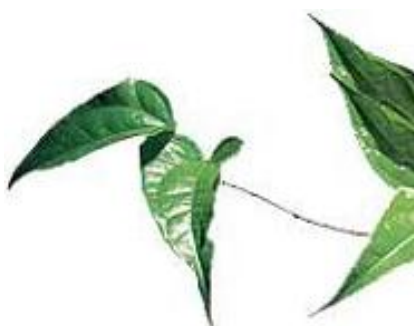
**Tabela I** – Componentes isolados de extratos de *Bidens pilosa* (LASTRA VALDES, 2001)

COMPONENTE	(%)	ATIVIDADE BIOLÓGICA
<b>Extrato com éter de petróleo</b>		
Fenilheptatrina	0,003	antimicrobiana, fungicida, anti-helmíntica, antiprotozoária, cercaricida
ácido linoléico	0,005	bacteriostático, fungicida
ácido a - linolênico	0,006	bacteriostático, fungicida
Esqualeno	0,008	bacteriostático, fungicida
Friedelina	0,007	antiinflamatório, anticonvulsivante, fungistático
Friedelan-3-b-ol	0,004	antiinflamatório, anticonvulsivante
Estigmasterol, o-sitosterol, campesterol	0,003	antibacteriano
triglicerídeos	0,4	
n-alcanos	0,03	antibacteriana
<b>Extrato metanólico</b>		
luteolina 7-O-b-D- glucopiranosídeo	0,005	antiinflamatório
quercetina 3-O-b-D- glucopiranosídeo	0,01	antiinflamatório
quercetina 3-O-b-D- galactopiranosídeo	0,006	antiinflamatório
<b>Extrato metanol / água</b>		
quercetina 3-o-b-D	0,02	antiinflamatório

Contudo, não foram encontrados dados a respeito de atividade genotóxica e/ou mutagênica da planta, nas formas mais ingeridas pela população, seja em infuso ou em decocto.

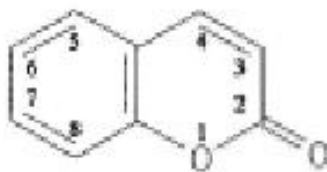
#### 1.4.2 Guaco (*Mikania glomerata* Sprengel)

O guaco é uma trepadeira sublenhosa, perene, de grande porte, com folhas obtusas na base, de forma quase deltóide, cor verde escura e flores brancas reunidas em capítulos congestionados, atingindo ramificações entre 2 e 2,5m (Figura 05). Ela ocorre em praticamente todos os países da América do Sul e Central tendo ampla distribuição no Brasil e sendo suas folhas muito utilizadas pela população.



**Figura 05** – Folhas de *Mikania glomerata* Sprengel  
(foto extraída de [www.plantamed.com.br](http://www.plantamed.com.br)).

Segundo Botsaris (1995), esta planta facilita a fluidificação dos exsudatos traqueobrônquicos estimulando sua secreções de maneira que possam ser mais facilmente expulsos pelo reflexo da tosse. Atua relaxando a musculatura lisa das vias aéreas, principalmente brônquios. A principal substância responsável por esse efeito é a cumarina, bem conhecida e definida quimicamente (OLIVEIRA et al., 1993; CABRAL et al., 2001), conforme representada na Figura 06:



**Figura 06** – Estrutura química da cumarina (US department of health and human service, 1993).

Estudos apontam as cumarinas como potenciais substâncias para o tratamento de câncer (LIN et al., 1996), inclusive por inibir o crescimento e provocar a morte de diversas linhagens de células tumorais, o que reforça a necessidade de estudos toxicológicos sobre elas (FÁTIMA et al., 2005).

Fierro et al. (1999) e Holetz et al. (2002) sugerem, ainda, atividade antifúngica, antimicrobiana, antialérgica e antiinflamatória. Também possui acentuado efeito antiofídico, principalmente contra veneno crotálico (cascavéis – *Crotalus durissimus terrificus*), segundo Maiorano et al. (2005).

Folhas de guaco em extrato etanólico também comprovaram atividade antialérgica, por inibição de infiltração granulocítica estimulada por antígeno, além de impedir degranulação mastocitária antígeno induzida (FIERRO et al., 1999).

Esta planta, assim como o picão-preto, já passou por diversos estudos fitoquímicos, onde foram encontrados: ácido caurenóico, estigmasterol, flavonóides, cumarina (SILVEIRA; SÁ et al., 2003) além de sesquiterpenos (VILEGAS et al., 1997) e guacosídeos.

Da mesma forma que observado com o picão-preto, não foram encontrados relatos sobre possível mutagenicidade relacionada ao infuso ou decocto desta planta.

### **1.4.3 Preparação dos extratos testados**

#### **1.4.3.1 Infusão**

Infusão é uma forma extrativa que consiste em lançar sobre uma droga água fervente, mantendo-se o sólido e o líquido em contato, encerrados em recipiente fechado durante certo tempo (SIMÕES et al., 2001). É uma técnica aplicada, principalmente, a substâncias de estrutura branda, constituída por tecidos comparativamente moles (folhas, flores, inflorescências) (PRISTA et al., 1981). As infusões utilizadas no presente trabalho foram obtidas adicionando-se 1000mL de água ultrapurificada (milliQ) a 96°C em 50g de folhas de *M. glomerata* ou 50g de planta inteira, sem raízes, de *B. pilosa*, previamente picadas, procedendo-se filtração simples após 45 minutos de repouso em recipiente fechado (FARMACOPÉIA PORTUGUESA, 1997) e protegido da luz.

#### **1.4.3.2 Decocção**

Esta forma extrativa, segundo Prista et al. (1981), caracteriza-se por manter o sólido em contato com um líquido solvente em ebulição durante certo tempo. Costuma ser usada em casos restritos, com drogas muito compactadas e de natureza lenhosa (caule, casca, raízes e sementes) (SIMÕES et al., 2001). Produto da decocção, o decocto utilizado no presente trabalho foi preparado a partir da fervura de 100g de planta inteira, sem raízes, em 1500mL de água ultrapura (milliQ), até o volume final de 1000mL, procedendo-se, em seguida, a filtração simples (FARMACOPÉIA PORTUGUESA, 1997).

### 1.4.3.3 Maceração

O termo maceração designa a operação na qual a extração da matéria-prima vegetal é realizada em recipiente fechado, em diversas temperaturas, durante um período prolongado (horas ou dias), sob agitação ocasional e sem renovação do líquido extrator (SIMÕES et al., 2001). Líquidos muito voláteis são raramente utilizados. Contudo, não se recomenda o uso de água ou misturas hidroalcoólicas com concentrações de etanol inferiores a 20% devido à possibilidade de contaminação microbiana. O macerado utilizado neste trabalho foi obtido após 24h de maceração simples das folhas, em proporção planta:solvente 1:5 (m/V) e fornecido pela Profa. Andréa Diniz, do Departamento de Tecnologia de Alimentos e Medicamentos (TAM) do Centro de Ciências Agrárias (CCA) da Universidade Estadual de Londrina (UEL).

### 1.4.4 Quantificação de cumarina

A quantificação de cumarina contida no infuso e no macerado de *M. glomerata* em etanol 80% foi realizado por meio de cromatografia líquida de alta eficiência - ultravioleta (CLAE-UV), conforme método descrito por Celeghini et al. (2001). As análises foram realizadas em cromatógrafo líquido (Shimadzu), bomba modelo LC6A, detector por ultra-violeta, e integrador modelo C-R6A, injetor manual Rheodyne modelo 7125 com alça dosadora de 20 µl, coluna analítica Shim-Pack ODC-18 (4,6 x 250mm, 5µm), pré-coluna RP-18 (Lichrospher® 100, 5 µm, 4 x 4mm, Merck), utilizando-se acetonitrila e água como solventes da fase móvel. Os solventes foram filtrados através de membrana (HVHP) e desaerados em banho de ultrassom. A fase móvel foi eluída em fluxo de 0,7mL/min, em sistema isocrático acetonitrila: água (40:60 v/v). A detecção foi realizada a 274nm.

A metodologia foi validada nos parâmetros de linearidade, recuperação, repetibilidade e precisão intermediária.

## 2 JUSTIFICATIVA

A exposição do homem a agentes mutagênicos tem aumentado consideravelmente desde a revolução industrial, seja pelo aumento de poluentes lançados no meio, seja pela modificação dos hábitos alimentares ou mesmo pelo ritmo de vida altamente estressante levado pelas pessoas.

A interação desses agentes aliada à suscetibilidade genética de cada indivíduo apresenta-se como um fator poderoso de desenvolvimento de mutações no DNA celular, podendo gerar assim processos cancerígenos. Uma prova disso é o número crescente de casos de câncer relatados nas últimas décadas.

Desta forma, conhecer a propriedade mutagênica das substâncias ingeridas ou utilizadas pela população constitui um importante meio de prevenção do desenvolvimento do câncer. Além disso, a descoberta de substâncias capazes de combater essa patologia, ou mesmo o maior conhecimento sobre seus mecanismos de ação, certamente irá contribuir para melhora na expectativa de vida dos pacientes acometidos, podendo, em última instância, resultar em cura definitiva.

O presente trabalho avalia o potencial mutagênico de duas plantas muito utilizadas pela população brasileira e mundial para fins terapêuticos: o picão-preto (*Bidens pilosa* Liné) e o guaco (*Mikania glomerata* Sprengel), que, apesar de terem sido alvos de diversos estudos fitoquímicos, não o foram, até o presente, nessa área de mutagênese.

Assim sendo, esta pesquisa pode contribuir para o conhecimento de efeitos genotóxicos dos chás das plantas medicinais estudadas, ou mesmo, revelar potenciais mutagênicos antes não conhecidos, colaborando assim para o acúmulo de informações e conseqüentemente com a avaliação de perigo genético para a população, o qual, se possível, deve ser minimizado.

### 3 OBJETIVOS

A utilização de plantas visando à cura de processos patológicos é comum, sobretudo na medicina popular brasileira, onde a transmissão dos conhecimentos indígenas e dos colonizadores fez desse procedimento uma terapia muito confiável pela população. O consumo de picão-preto (*Bidens pilosa* Liné) e de guaco (*Mikania glomerata* Sprengel), na forma de chás, ocorre com frequência em nossa sociedade. Como os efeitos dessas duas plantas relacionados à possibilidade indutora de mutagênese ainda não foram esclarecidos cientificamente, o presente trabalho tem por base os seguintes objetivos:

#### 3.1 OBJETIVOS GERAIS

Investigar os efeitos genotóxicos, *in vitro*, de extratos das plantas picão-preto (*Bidens pilosa* Liné) e guaco (*Mikania glomerata* Sprengel), em cultura de células de hepatoma de rato (HTC - sigla do termo inglês Hepatoma Tissue Culture), por meio dos testes de cometa e de micronúcleo.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar a capacidade dos extratos de *Bidens pilosa* L. preparados na forma de infuso e decocto e aplicados em diferentes concentrações, em induzir danos no material genético de células HTC, por meio dos testes de cometa e de micronúcleo.

Avaliar os efeitos genotóxicos e mutagênicos de infusão e extrato etanólico de *Mikania glomerata* Sprengel., aplicados em diferentes concentrações, em células HTC em cultivo, por meio dos testes de cometa e micronúcleo.

Analisar e comparar os efeitos das duas formas extrativas de cada planta, buscando verificar se há uma forma mais prejudicial ao DNA, bem como

apontar causas prováveis para possíveis diferenças.

Tomando por base as doses sugeridas para consumo humano, avaliar o potencial genotóxico de diferentes concentrações dos extratos *in vitro*.

**“Avaliação *in vitro* do potencial mutagênico de *Bidens pilosa* Liné e de *Mikania glomerata* Sprengel, por meio de ensaio do cometa e teste de micronúcleo”**

*Ronaldo de Jesus Costa <sup>a</sup>, Berenice Quinzani Jordão <sup>a</sup>, Mário Sérgio Mantovani.<sup>a</sup>, Andréia Diniz <sup>b</sup>.*

*<sup>a</sup> Departamento de Biologia Geral, Universidade Estadual de Londrina, Campus Universitário, Caixa Postal 6001, 86.051-990 - Londrina, PR, Brasil.*

*<sup>b</sup> Departamento de Tecnologia de Alimentos e Medicamentos, Universidade Estadual de Londrina, Campus Universitário, Caixa Postal 6001, 86.051-990 - Londrina, PR, Brasil.*

Artigo a ser submetido à Revista ***Journal of Ethnopharmacology*** – Elsevier

## Resumo

O consumo de *Bidens pilosa* Liné e de *Mikania glomerata* Sprengel na forma de chás ocorre com frequência na sociedade, principalmente em casos de icterícia e de afecções de vias aéreas superiores, respectivamente. Para averiguar a capacidade destes chás em induzir danos ao DNA e efeitos clastogênicos ou aneugênicos, foram utilizados o ensaio do cometa (*single-cell gel electrophoresis* –SCGE- assay) e o teste de micronúcleo (MN), *in vitro*, em células metabolizadoras de hepatoma de *Rattus norvegicus* (células HTC). Os chás testados tiveram diferentes formas de preparo: infuso de guaco – *Mikania glomerata* (IM) e de *Bidens pilosa* (IB), macerado de *M. glomerata* em etanol 80% (MM80) e decocto de *Bidens pilosa* (DB). As concentrações utilizadas para infuso e decocto foram 10, 20 e 40µL/mL de meio de cultura. O extrato etanólico foi testado em doses de 2,5, 5, 10 e 20µL/mL de meio de cultura. A quantidade de cumarina presente em IM e MM80 foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência – UV (CLAE-UV). Metilmetanosulfonato (MMS) foi utilizado como controle positivo, tampão fosfato (PBS pH 7,4) como controle negativo e etanol 80% como controle do solvente. O teste do cometa demonstrou genotoxicidade para ambas as plantas, na maioria dos tratamentos. Os efeitos de IM e MM80 não demonstraram relação direta com a quantidade de cumarina presente em cada amostra. No teste do micronúcleo, somente IM 40µL/mL diferiu do controle negativo, demonstrando mutagenicidade. Os resultados indicaram danos ao DNA mais significativos em doses mais elevadas, sugerindo cuidados na utilização fitoterápica destas plantas.

## Abstract

The use of *Bidens pilosa* Liné and *Mikania glomerata* Sprengel in the form of teas occurs with frequency in the society, mainly in cases of jaundice and affection of superior aerial ways, respectively. The capacity of these teas in inducing DNA-damages and clastogenic or aneugenic effects was examined *in vitro*, using the comet assay or single-cell gel electrophoresis (SCGE) assay and the micronucleus test (MN), in Hepatoma Tissue Culture cells (HTC) of *Rattus norvegicus* (metabolically competent cells). The tested teas had different forms of preparation: infusion of *guaco* - *Mikania glomerata* (IM) and *Bidens pilosa* (IB), Macerated leaves of *Mikania glomerata* in ethanol 80% (MM80) and decoction of *Bidens pilosa* (DB). The concentrations used for infusion and decoction were 10, 20 and 40 $\mu$ L/mL of culture medium. The ethanolic extract was tested in doses of 2.5, 5, 10 and 20 $\mu$ L/mL of culture medium. The quantity of coumarin in IM e MM80 was determined by high efficiency liquid chromatography – UV (HELIC-UV). Methyl methanesulfonate (MMS) was used as positive control; phosphate-buffered solution (PBS Ph 7,4) was the negative control and ethanol 80% the solvent control. The comet assay demonstrated to genotoxicity for both the plants, in the majority of the treatments. The IM and MM80 effects did not show direct relationship with the coumarin quantity present in each sample. In the micronucleus test, only IM 40 $\mu$ L/mL differed from the negative control, demonstrating its mutagenicity. The results indicated damages to the DNA most significant in higher doses, suggesting careful use of these plants in phytotherapy.

## Introdução

A utilização de determinadas plantas no combate a doenças é um costume comum na sociedade humana. Contudo, na utilização popular, seja como fitoterapia, seja na dieta, na maioria das vezes não se tem comprovação da eficácia no tratamento ou avaliação apropriada dos possíveis efeitos adversos causados (SILVEIRA; SÁ et al., 2003). Ferrari (1991) alerta para a utilização de métodos confiáveis capazes de detectar e medir o dano no DNA, bem como de estabelecer possibilidades de proteção ou redução desses efeitos.

O picão – preto (*Bidens pilosa* Liné), da família Asteraceae, possui altura entre 30-100cm e flores amarelas (ABAJO et al., 2004); tem ampla dispersão nos trópicos e sub-trópicos, desde o nível do mar até cerca de 3000m de altitude (BALLARD, 1986). Por onde ocorre é adotado como fitoterápico, em especial em desordens hepáticas (hepatite e icterícia) (VASQUES et al., 1986). Segundo Brandão et al. (1998), o chá é adotado na medicina popular como antiinflamatório, diurético, anti-reumático, antidiabético. Ainda mostra alta atividade bactericida (RABE; VAN STADEN, 1997), bem como efeitos antioxidantes e imunomodulatórios (ABAJO et al., 2004), além de atividade antimalárica (BRANDÃO et al., 1997; OLIVEIRA et al., 2004). É rico em quercetina (HOFFMANN; HÖLZL, 1989; LASTRA VALDES, 2001) e outros compostos polifenólicos (RICE-EVANS et al., 1996), que podem ser responsáveis pelas atividades antioxidantes observadas (VAN ACKER et al., 1996).

O guaco (*Mikania glomerata* Sprengel, *Compositae*) é uma planta do tipo cipó-trepadeira, com folhas opostas, simples, ovais e acuminadas e flores brancas

em forma de pequenos capítulos longipedunculados. Originário da América do Sul, ele ocorre em todo o continente, estendendo-se até alguns países da América Central. A planta é utilizada principalmente como expectorante no tratamento de afecções respiratórias, promovendo a fluidificação dos exsudatos traqueobrônquicos (BOTSARIS, 1995). Ela possui atividades antifúngica, antimicrobiana, antialérgica e antiinflamatória (FIERRO et al., 1999; HOLETZ et al., 2002), além de acentuado efeito antiofídico (MAIORANO et al., 2005). Estudos apontam as cumarinas, um de seus princípios ativos (OLIVEIRA et al., 1993; CABRAL et al., 2001), como potenciais substâncias para o tratamento de câncer (LIN et al., 1996), inclusive por inibir o crescimento e provocar a morte de diversas linhagens de células tumorais, o que reforça a necessidade de estudos toxicológicos sobre elas (FÁTIMA et al., 2005).

Contudo, da mesma forma que observado com o picão-preto, não são encontrados relatos sobre possíveis efeitos genotóxicos e mutagênicos do guaco relacionados às formas mais consumidas pela população, os chás.

Sendo assim, este trabalho procurou avaliar o potencial de indução de danos ao DNA destas duas plantas, *M. glomera* Sprengel e *B. pilosa* Liné, *in vitro*, usando chás preparados tanto por infusão, decocção ou maceração em etanol 80%, tomando como base de cálculo as dosagens que são recomendadas para o consumo diário humano.

## **Materiais e métodos**

### **Cultura celular**

No presente estudo, células de hepatoma de rato (*Rattus norvegicus*) - células HTC – adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro, da Universidade Federal do Rio de Janeiro - foram cultivadas em monocamada aderida a frascos de cultura estéreis, de 25cm<sup>2</sup> para o teste do micronúcleo e em tubos de cultura de 2,5mL para o teste do cometa. Para o cultivo utilizou-se o meio de cultura D-MEM-F12 (GibcoBRL), suplementado com 10% de soro bovino fetal – SBF (Gibco). A incubação foi feita a 37°C em estufa tipo BOD e, nestas condições, um ciclo celular teve duração de cerca de 24h. As células foram redistribuídas em sub-culturas, onde cresciam por cerca de 3~4 dias até se estabilizarem no meio de cultura. Quantidade fixa de células para cada tipo de ensaio foi então distribuída nos frascos de cultura, onde permanecia por pelo menos um ciclo celular completo antes de receber os tratamentos experimentais.

### **Extratos testados**

Quatro extratos foram testados, três dos quais em forma de chás das plantas *in natura*, preparados segundo a Farmacopéia Portuguesa 6ed. (1997), a saber: a) infuso de *Bidens pilosa* Liné (IB), b) decocto de *Bidens pilosa* Liné (DB), obtidos a partir da planta inteira sem raízes; c) infuso *Mikania glomerata* Sprengel (IM),, obtida

das folhas e d) um extrato alcoólico *M. glomerata*, preparado por maceração simples em etanol 80% (M80) a partir de folhas.

Das soluções testadas neste trabalho, o infuso foi obtido adicionando-se 1000mL de água ultrapurificada (milliQ) à temperatura de 96°C em 50g das folhas levemente picadas e filtrando-se, por filtração simples, após 45 minutos. O decocto, por sua vez, foi preparado a partir da fervura, de 100g de planta em 1500mL de água ultrapurificada (milliQ), por cerca de 1 hora, tempo necessário para ocorrer a redução até o volume final de 1000mL, procedendo-se em seguida à filtração simples. O extrato etanólico foi obtido após 24h de maceração simples das folhas, em etanol 80% (uma vez que esta foi a diluição mais efetiva para extração de cumarinas), em proporção planta:solvente de 1:5 (m/V) e fornecido pela Profa. Andréa Diniz, do Departamento de Tecnologia de Alimentos e Medicamentos (TAM) do Centro de Ciências Agrárias (CCA) da Universidade Estadual de Londrina (UEL). Estas soluções-teste foram armazenadas a uma temperatura de 20°C negativos.

As concentrações utilizadas de infuso e decocto, no teste do MN foram de 20 e de 40µL/mL de meio de cultura. Já no ensaio do cometa, estas foram de 10, 20 e 40µL/mL de meio. Estas três concentrações foram calculadas tomando por base os índices de 50, 100 e 200% da dose de ingestão diária recomendada (IDR) para consumo de infusão e decocto (IDR= 250mL 4 vezes ao dia para uma pessoa de 70kg).

O macerado em etanol 80%, contudo, por ter sido elaborado com uma proporção planta:solvente quatro vezes maior que os chás, no ensaio do cometa foi testado em doses finais 4 vezes menores: 2,5, 5 e 10µL/mL de meio de cultura, além da dose de 20µL/mL para fins comparativos. No teste do MN, as únicas concentrações utilizadas para este extrato foram as de 5 e 10µL/mL de meio.

Como indutor de danos (controle positivo) utilizou-se o agente alquilante e clastogênico metilmetanossulfonato (MMS), a diferentes concentrações, conforme o ensaio biológico. Como controle negativo utilizou-se tampão fosfato, PBS (do inglês: *phosphate-buffered solution*) livre de  $\text{Ca}^{++}$  e  $\text{Mg}^{++}$ , pH 7,4, a  $30\mu\text{L}/\text{mL}$  de meio de cultura, ou o controle de solvente etanol 80%, nas concentrações finais de  $10\mu\text{L}/\text{mL}$  e  $20\mu\text{L}/\text{mL}$  de meio de cultura.

### **Quantificação de cumarina**

A quantificação de cumarina contida na infusão e no extrato etanólico de *Mikania glomerata* Sprengel foi realizado por meio de cromatografia líquida de alta eficiência - ultravioleta (CLAE-UV), conforme método descrito por Celeghini et al. (2001). As análises foram realizadas em cromatógrafo líquido (Shimadzu), bomba modelo LC6A, detector por ultra-violeta, e integrador modelo C-R6A, injetor manual Rheodyne modelo 7125 com alça dosadora de  $20\mu\text{l}$ , coluna analítica Shim-Pack ODC-18 (4,6 x 250mm,  $5\mu\text{m}$ ), pré-coluna RP-18 (Lichrospher® 100,  $5\mu\text{m}$ , 4 x 4mm, Merck), utilizando-se acetonitrila e água como solventes da fase móvel. Os solventes foram filtrados através de membrana (HVHP) e desaerados em banho de ultrassom. A fase móvel foi eluída em fluxo de  $0,7\text{mL}/\text{min}$ , em sistema isocrático acetonitrila:água (40:60; v/v). A detecção foi realizada a 274nm.

A metodologia foi validada nos parâmetros de linearidade, recuperação, reprodutibilidade e precisão intermediária.

## Teste do cometa

Aproximadamente  $0,5 \times 10^5$  células HTC previamente estabilizadas como descrito anteriormente foram distribuídas e incubadas em tubos de cultura contendo 2,5mL de meio de cultura enriquecido com soro bovino fetal, por 24h. O tratamento com as soluções teste foi efetuado nas concentrações de 10, 20 e 40 $\mu$ L/mL no caso dos chás e de 2,5, 5, 10, e 20  $\mu$ L/mL do extrato etanólico. Utilizou-se MMS como controle positivo, na concentração final de 90 $\mu$ M e PBS (pH 7,4) como controle negativo, na concentração final de 30 $\mu$ L/mL. Como controle do solvente utilizou-se etanol 80% nas concentrações finais de 10 e 20 $\mu$ L/mL, para averiguar possível interferência do etanol nos resultados do macerado de *M. glomerata* em etanol 80%. Após 2h de tratamento, as células foram colhidas, usando tripsina a 0,025%, centrifugadas e ressuspendidas em meio de cultura. Posteriormente, seguiu-se o protocolo de Speit e Hartmann (1999).

Após a colheita, 20 $\mu$ L da suspensão celular foram homogeneizados com 120 $\mu$ L de agarose de baixo ponto de fusão (LMP) a 0,5% e mantida a 37°C. A mistura foi distribuída sobre lâminas de microscopia, pré-gelatinizadas com agarose de ponto de fusão normal a 1,5%. As lâminas foram cobertas com lamínula e mantidas sob resfriamento a 4°C para solidificação do gel. Depois de 20 minutos, as lamínulas foram retiradas e as lâminas imersas em solução de lise gelada [89mL de solução estoque (solução aquosa 2,5M NaCl, 100mM EDTA, 10mM Tris-EDTA, NaOH qsp pH10, laurilsarcosinato de sódio a 1%) com adição de 1mL de Triton X-100 e 10mL de DMSO], em recipiente protegido da luz por 24 horas, sob refrigeração, para lise das membranas celulares. As lâminas foram então dispostas em cuba de eletroforese, cobertas com tampão para eletroforese (300mM NaOH e

1mM EDTA, a pH>13), mantidas no escuro, em banho de gelo a aproximadamente 4°C para desnaturação alcalina do DNA, por 20 minutos. Realizou-se então a corrida de eletroforese a 300mA e 1,6V/cm por mais 20 minutos. As lâminas foram neutralizadas com tampão Tris-HCl 0,4M, pH7,5, em três ciclos de cerca de 5 minutos cada um, secas ao ar e fixadas em etanol absoluto por 10 minutos. Então, foram armazenadas em refrigerador.

As lâminas foram coradas no momento da análise com 100µL de brometo de etídio 2µg/mL e cobertas com lamínulas. A leitura foi feita em microscópio de fluorescência usando filtro de excitação com  $\lambda \sim 420-490\text{nm}$  e filtro de barreira de 590nm em aumento de 400 vezes. Com base nos critérios estabelecidos por Kobayashi et al., (1995), analisou-se 100 núcleos por lâmina classificando-os em: classe 0 (ausência de cauda); classe 1 (cauda com até uma vez o diâmetro do núcleo do cometa); classe 2 (cauda com até duas vezes o diâmetro do núcleo do cometa); classe 3 (cauda com mais de 2 vezes o diâmetro do núcleo do cometa). Células apoptóticas não foram contabilizadas na análise (SPEIT et al., 1996). Em 300 células analisadas por tratamento, foi calculado o escore médio de danos multiplicando-se o número de células com dano observado em cada classe de dano pelo valor da classe, nas três repetições, de acordo com a fórmula:

$$\text{Escore médio} = \frac{\sum (0 \times n_0) + (1 \times n_1) + (2 \times n_2) + (3 \times n_3)}{3}$$

onde n= número de células em cada classe de dano

### **Teste do micronúcleo (MN)**

Para o teste do MN, as células previamente estabilizadas foram incubadas em meio de cultura completo por 1,5 ciclo celular (36h), que foi seguido, logo após a troca do meio de cultura e a lavagem com 5mL de tampão PBS pH 7,4, do tratamento por 4h com as substâncias-teste: chás (infuso e decocto) das duas plantas nas concentrações de 20 e 40 $\mu$ L/mL de meio e extrato alcoólico de *Mikania glomerata* a 5 e 10 $\mu$ L/mL de meio. Também foram dados os tratamentos com as soluções de 30 $\mu$ L/mL de PBS como controle negativo e de MMS a 0,3mM como controle positivo. O meio de cultura foi então trocado novamente por meio fresco, após nova lavagem das células com 5mL de PBS por duas vezes para retirada de qualquer resquício de substância-teste. Adicionou-se então 10 $\mu$ L/mL de citocalasina-B (300 $\mu$ L/mL) ao meio fresco e prosseguiu-se a incubação por mais 20h, para obtenção de células binucleadas, conforme descreve Fenech (1997). A colheita das células e o preparo das lâminas foi feita segundo Salvadori et al. (1993). Para coloração utilizou-se corante de Rosenfeld (May Grunwald 0,053%, 0,097% Giemsa em metanol). Os critérios utilizados para análise foram os estabelecidos por Fenech (2000). Os tratamentos foram realizados em triplicata, em experimentos independentes e em cada lâmina foram analisadas 2000 células binucleadas (GARRIOT et al., 2002).

### **Análise estatística**

Para a análise estatística dos dados realizou-se ANAVA entre todos os resultados de cada ensaio e aplicou-se o teste de DUNNET de médias, comparando

o número médio de células com dano, tanto no teste do cometa como no teste de micronúcleo, obtido dos experimentos em triplicata, com o número médio obtido nos controles PBS ou MMS. O nível de probabilidade admitido foi de 5% de significância ( $p < 0,05$ ).

## Resultados

Os resultados obtidos com todas as formas de extratos das duas plantas avaliadas pelos ensaios biológicos aplicados, Cometa e MN, são mostrados na Tabela I.

Em primeiro lugar, analisando os resultados do ensaio do cometa, observa-se que a infusão de guaco *Mikania glomerata* Spreng. (IM) não induziu danos estatisticamente significativos ao DNA no tratamento IM10, mas apresentou-se genotóxica nas doses IM20 e IM40 (calculadas considerando as proporções de 100 e 200% da dose de ingestão recomendada - IDR), ressaltando a ocorrência de um efeito dose-dependente (Figura 1).

Por sua vez, o macerado de *M. glomerata* em etanol 80% (MM80) não apresentou diferença estatisticamente significativa em relação ao controle nas doses de MM80 2,5 e MM80 5, mas apresentou genotoxicidade nos tratamentos MM80 10 e MM80 20, ou seja, quando usado em doses muito altas (calculadas com base em 200 e 400% da IDR). Os tratamentos-controle com etanol a 80% não diferiram estatisticamente do controle negativo com PBS.

No caso do picão-preto (*Bidens pilosa* L.), por sua vez, a frequência de células com danos induzida pelo infuso diferiu estatisticamente do controle nas três dosagens testadas. Este potencial genotóxico de IB mostrou efeito dose-resposta

evidente, tendo o tratamento IB40 produzido resultados muito semelhantes aos do MMS (Figuras 1 e 2). A outra forma estudada desta planta, o decocto, também mostrou-se genotóxica nas três concentrações testadas. Contudo, verifica-se, pelo número de células danificadas e pelo escore de dano (Figuras 2 e 3), que esse efeito ocorreu em níveis inferiores aos do infuso (IB). Ainda por meio do ensaio do cometa, é possível observar que o escore de dano foi elevado com as mais altas concentrações, tanto do guaco (IM, MM80) quanto do picão-preto (IB), a ponto de MM80 20 e IB40 chegarem a apresentar escores maiores que o do próprio MMS (Figura 3). Este escore aumentado reflete um deslocamento havido do número de células com dano para as classes de danos mais altas, como mostrado na Tabela I.

Em segundo lugar, no teste de micronúcleo, foram testadas somente as dosagens mais altas (20 e 40 $\mu$ L/mL de meio de cultura), tanto para *M. glomerata* quanto para *B. pilosa*, referenciadas em 100 e 200% da IDR. Os resultados demonstraram que, de todos os tratamentos efetuados, somente o tratamento IM40 diferiu do controle negativo. Todos os demais tratamentos não apresentaram potencial mutagênico. De fato, verifica-se tanto na Figura 4 como na Figura 5 que IM40 foi o único tratamento que apresentou um aumento significativo da média de células com MN.

Comparando os resultados obtidos entre os dois ensaios (Figura 5), verifica-se que as respostas positivas obtidas no ensaio do cometa foram bem mais acentuadas do que as obtidas no teste do MN. À exceção do tratamento IM40, que mostrou um pico na linha de células com MN, todos os demais tratamentos e concentrações apresentaram uma resposta bem distinta ao do controle positivo (MMS) no teste do MN, diferentemente da resposta obtida com o ensaio do cometa.

Efetuando-se a comparação entre dose utilizada e efeitos causados no teste

do cometa, nota-se, exceto para DB, que quanto maior a dose utilizada maior a genotoxicidade causada, seja em número de células com cometa (Figura 1) seja em escore médio de danos causados (Figura 3), demonstrando assim, efeitos diretamente relacionados à dose testada (Figura 2). Este efeito teve relação aproximadamente linear para IM, enquanto que para MM80 e IB a relação foi quase exponencial, quando a dosagem mais alta, apesar de ser igual ao dobro da anterior, causou efeito cerca de cinco vezes maior. No teste de micronúcleo, o único tratamento que diferiu do controle foi IM40 (Figura 4), a maior dosagem testada do infuso, demonstrando, mais uma vez, correlação entre dose utilizada e efeito nocivo causado.

Com relação ao doseamento de cumarina, o sistema por cromatografia líquida de alta eficiência – UV (CLAE - UV) demonstrou ser adequado em todos os parâmetros validados, com sensibilidade e reprodutibilidade adequadas para o controle de qualidade de *M. glomerata* (CELEGHINI et al., 2001).

Neste sistema, a análise do infuso (IM) e do macerado de *Mikania glomerata* Sprengel em etanol 80% (MM80) mostrou uma concentração de cumarina de 27,26µg/mL e 1500µg/µL, respectivamente, o que permite determinar a quantidade de cumarina presente em cada concentração testada (Tabela II). Os cromatogramas (Figura 6) revelaram diversos picos divergentes entre as duas soluções, tendo o macerado apresentado uma quantidade maior de picos que o infuso. O pico da cumarina em IM foi de 9,331 minutos, enquanto que, em MM80 o pico ficou em 8,680 minutos.

**Tabela I** – Médias de células com cometa e de células com micronúcleo obtidas nos tratamentos-controles e nos tratamentos com infuso e macerado etanólico de *Mikania glomerata* Sprengel e infuso e decocto de *Bidens pilosa* Liné, em células HTC.

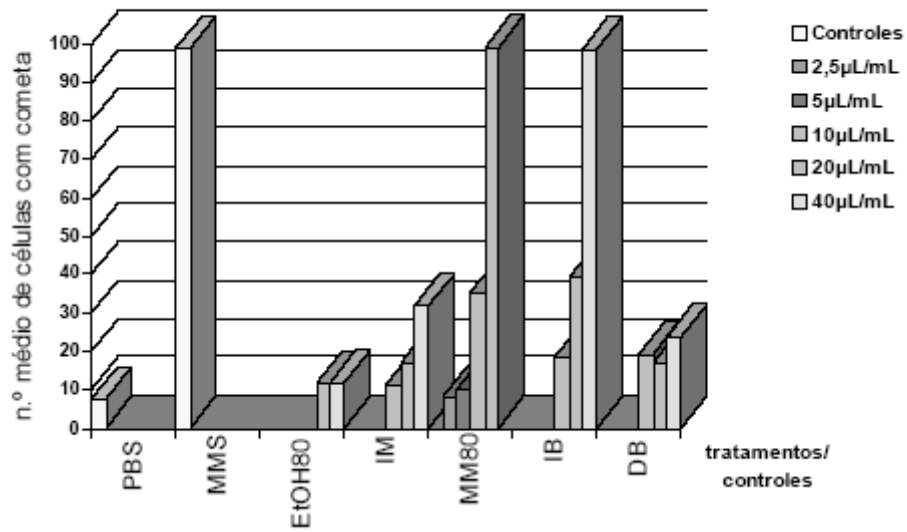
Tratamento ( $\mu\text{L}/\text{mL}$ )	Média de células com cometa $\pm$ DP	Classes de Cometa				Escore de danos	Média de células com MN $\pm$ DP
		0	1	2	3		
PBS	7,7 $\pm$ 1,5	92,7	5,7	1,7	-	9,0	8,3 $\pm$ 1,2
MMS	99,0 $\pm$ 1,2	0,7	50,7	41,0	8,3	158,3	42,7 $\pm$ 3,1*
EtOH 80° 10	11,6 $\pm$ 2,5	88,3	9,7	2,0	-	13,7	-
EtOH 80° 20	11,7 $\pm$ 0,0	88,3	9,7	1,7	0,3	14,0	-
IM10	11,3 $\pm$ 4,6	89,3	11,0	-	-	11,7	-
IM20	17,0 $\pm$ 5,0*	83,0	14,7	2,0	0,3	19,7	11,0 $\pm$ 1,7
IM40	31,7 $\pm$ 6,5*	68,3	29,7	2,0	-	33,7	14,7 $\pm$ 1,2*
MM80 2,5	8,0 $\pm$ 2,0	92,0	6,0	2,0	-	10,0	-
MM80 05	9,7 $\pm$ 1,5	90,3	7,7	2,0	-	11,7	11,7 $\pm$ 2,1
MM80 10	35,3 $\pm$ 1,5*	64,7	30,3	4,7	0,3	40,3	11,7 $\pm$ 1,5
MM80 20	99,3 $\pm$ 0,6*	0,3	18,3	76,0	5,3	186,3	-
IB10	18,3 $\pm$ 5,5*	81,7	17,3	1,0	-	19,3	-
IB20	39,3 $\pm$ 6,7*	60,7	32,3	5,0	2,0	48,3	11,7 $\pm$ 1,5
IB40	98,7 $\pm$ 2,3*	1,3	27,3	48,3	23,0	193,0	11,7 $\pm$ 0,6
DB10	19,3 $\pm$ 2,5*	80,7	19,0	0,3	-	19,7	-
DB20	17,0 $\pm$ 2,6*	83,0	16,0	1,0	-	17,7	9,0 $\pm$ 1,0
DB40	23,7 $\pm$ 3,0*	76,0	23,3	0,7	-	24,7	8,7 $\pm$ 0,6

PBS- tampão fosfato; MMS – metilmetanosulfonato; EtOH 80 – etanol 80%; IM – infuso de *M. glomerata*; MM 80 – macerado de *M. glomerata* em etanol 80%; IB – infuso de *B. pilosa*; DB – decocto de *B. pilosa*; DP - desvio padrão; MN – micronúcleo; \* - diferença significativa em relação ao PBS a 5% de significância.

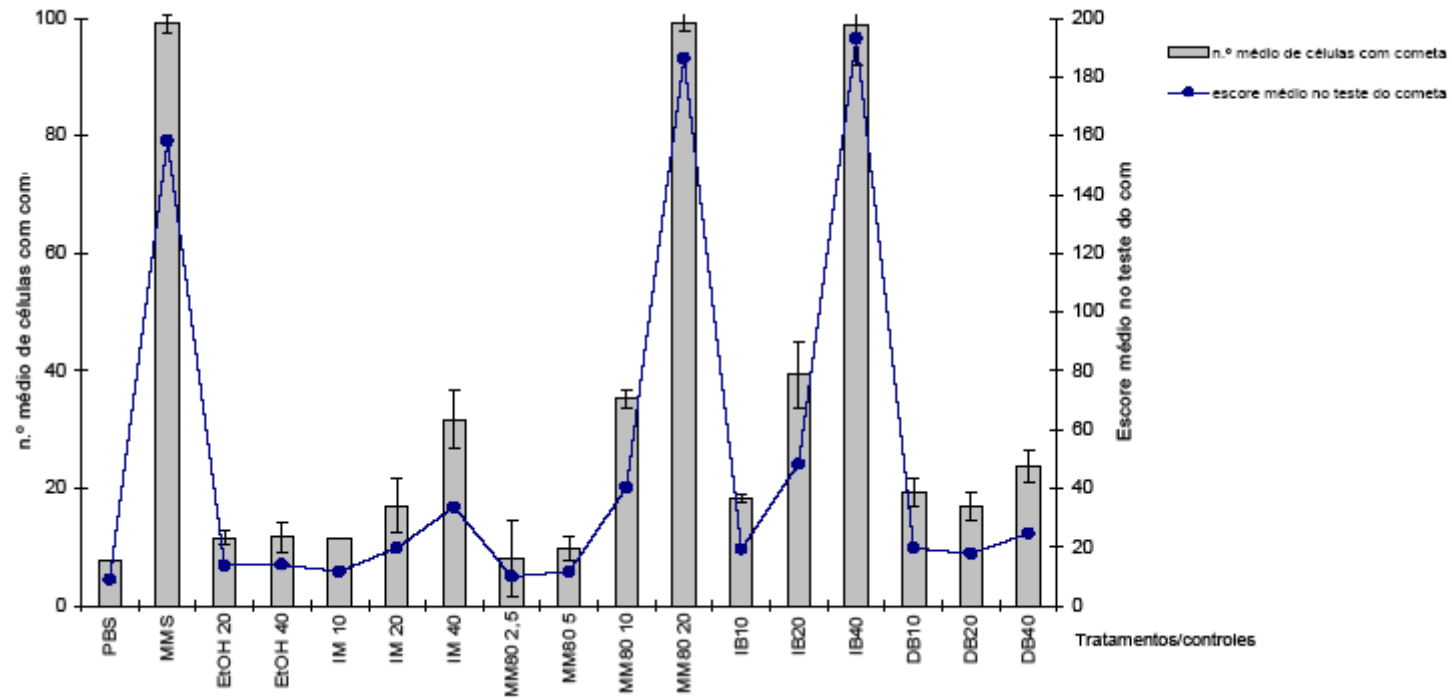
**Tabela II** – Concentração final de cumarina presente nas soluções usadas nos tratamentos *in vitro* com infuso e macerado em etanol 80% de *Mikania glomerata* Sprengel

<b>Tratamento</b> <b>(<math>\mu\text{L/mL}</math>)</b>	<b>Concentração final de cumarina</b> <b>(<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>
IM10	0,2726
IM20	0,5452
IM40	1,0904
MM80 2,5	3,78
MM80 5	7,5
MM80 10	15,0
MM80 20	30,0

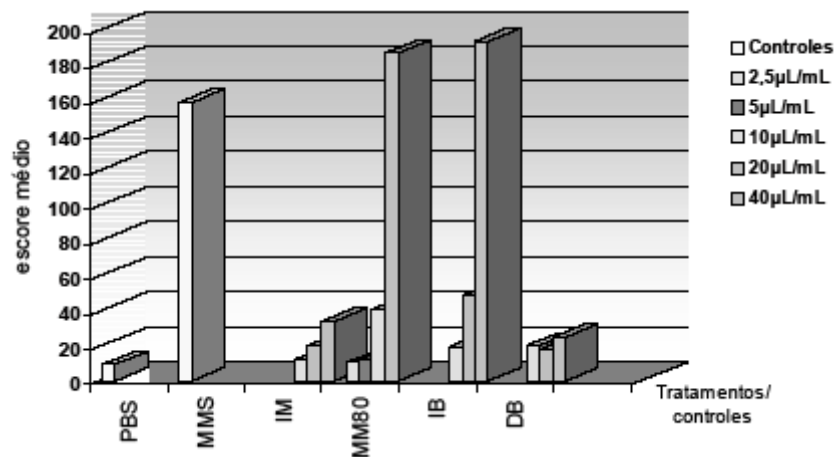
IM – Infusão de *M. glomerata*; MM80 – macerado de *M. glomerata* em etanol 80%



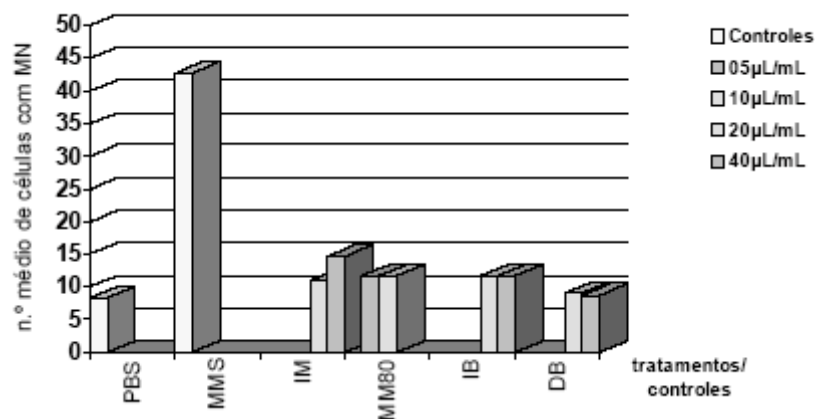
**Figura 1** – Freqüência média de células HTC com cometa, obtida nos controles: tampão fosfato (PBS), metilmetanosulfonato (MMS) e etanol 80% (EtOH 80) e nos tratamentos: infuso de *M. glomerata* (IM), macerado de *M. glomerata* em etanol 80% (MM80), infuso de *B. pilosa* (IB) e decocto de *B. pilosa* (DB), em diferentes concentrações.



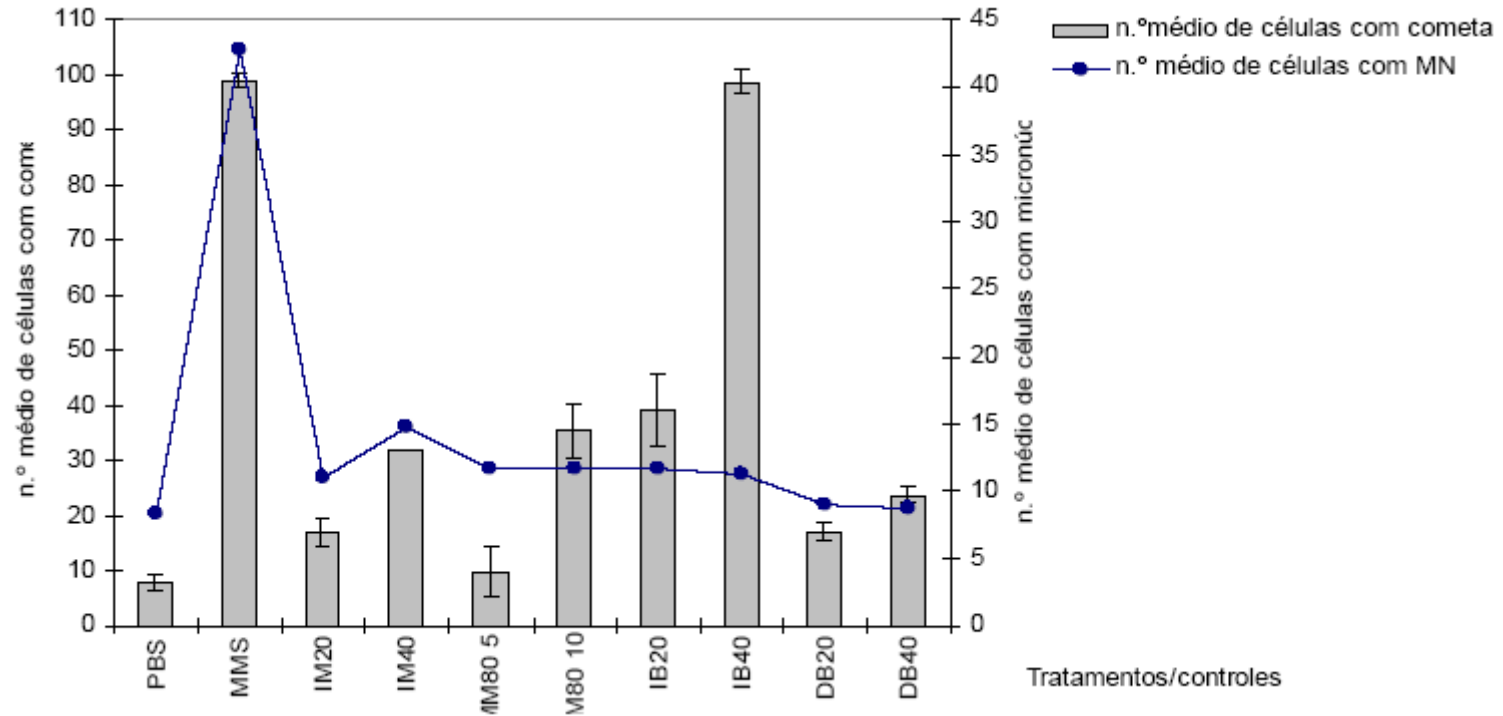
**Figura 2** – Número médio de células HTC com cometa e respectivos escores médios obtidos nos controles: tampão fosfato (PBS), metilmetanosulfonato (MMS) e etanol 80% (EtOH80) e nos tratamentos: infuso de *M. glomerata* (IM), macerado de *M. glomerata* em etanol 80% (MM80), infuso de *B. pilosa* (IB) e decocto de *B. pilosa* (DB), em diferentes concentrações.



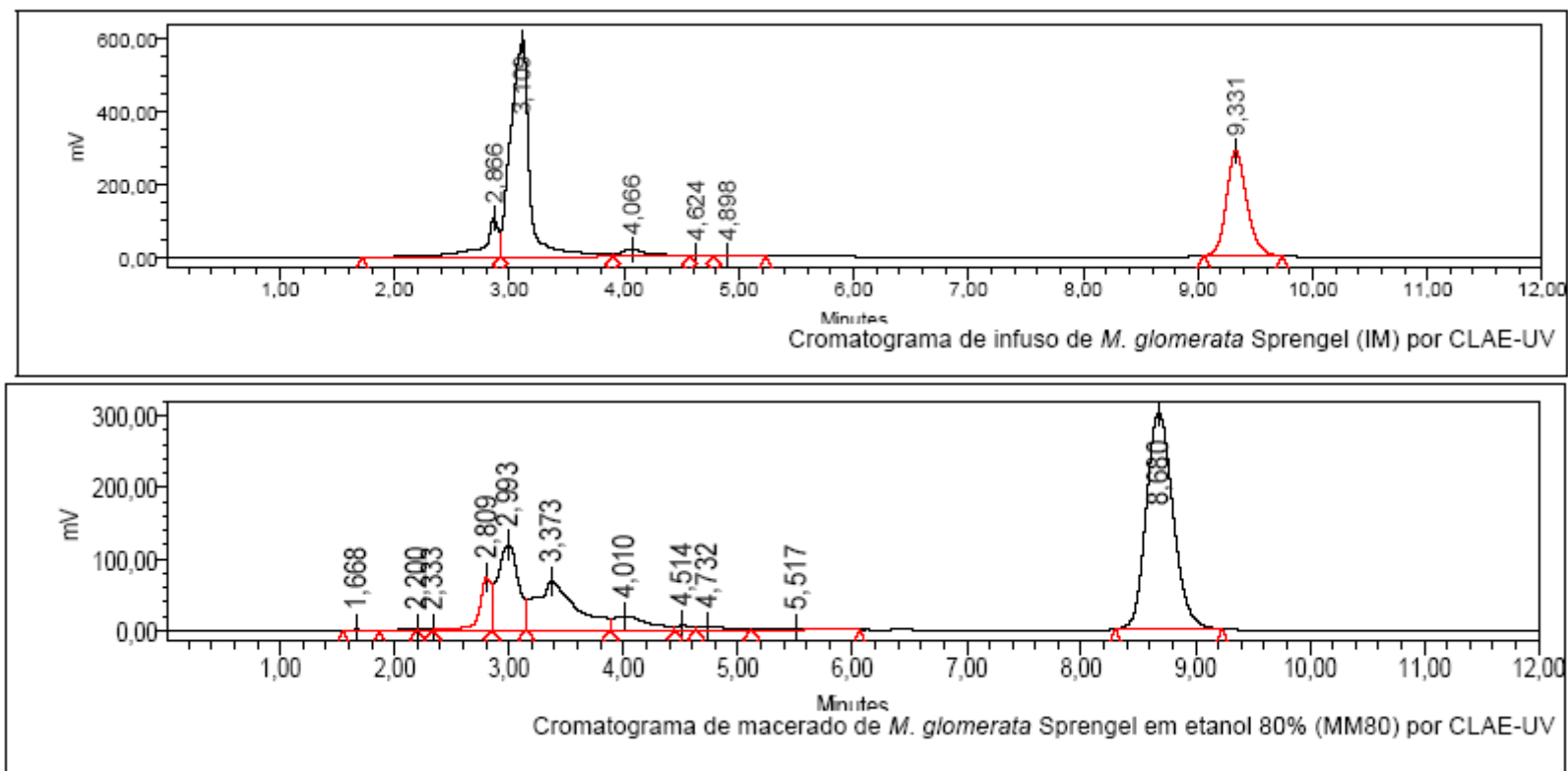
**Figura 3** – Escores médios obtidos nos controles: tampão fosfato (PBS), metilmetanosulfonato (MMS) e etanol 80% (EtOH 80) e nos tratamentos: infuso de *M. glomerata* (IM), macerado de *M. glomerata* em etanol 80% (MM80), infuso de *B. pilosa* (IB) e decocto de *B. pilosa* (DB), em diferentes concentrações.



**Figura 4** – Número médio de células HTC com MN obtido nos controles: tampão fosfato (PBS), metilmetanosulfonato (MMS) e etanol 80% (EtOH 80) e nos tratamentos: infuso de *M. glomerata* (IM), macerado de *M. glomerata* em etanol 80% (MM80), infuso de *B. pilosa* (IB) e decocto de *B. pilosa* (DB), em diferentes concentrações.



**Figura 5** – Comparação entre as médias dos resultados obtidos no teste do cometa e no teste do micronúcleo para os controles: tampão fosfato (PBS) e metilmetanosulfonato (MMS) - e tratamentos: infuso de *M. glomerata* (IM), macerado de *M. glomerata* em etanol 80% (MM80), infuso de *B. pilosa* (IB) e decocto de *B. pilosa* (DB), aplicados em diferentes concentrações.



**Figura 6** – Cromatogramas de infuso de *M. glomerata* (IM) e macerado de *M. glomerata* em etanol a 80% (MM80) obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência-UV (CLAE-UV).

## Discussão

Nas condições de avaliação utilizadas no presente estudo, as duas plantas averiguadas, guaco (*Mikania glomerata* Sprengel) e picão-preto (*Bidens pilosa* Liné) demonstraram genotoxicidade pelo teste do cometa.

No caso de *M. glomerata*, ainda que o aumento de genotoxicidade observado com o uso de sua infusão não tenha se dado exatamente na mesma proporção do aumento da dose, esta resposta foi dose-dependente. O macerado em etanol 80%, por sua vez, assim como ocorreu com a infusão, apresentou genotoxicidade nas doses mais elevadas. Este efeito genotóxico observado em MM80 certamente foi devido apenas às substâncias extraídas das folhas de guaco, uma vez que ficou demonstrado que a diluição em etanol 80, usado como controle de solvente, não causou genotoxicidade.

Comparando dosagens equivalentes de infuso e de macerado de *M. glomerata*, ou seja, IM20 e MM80 5, ambos correspondentes ao valor assumido como 100% da IDR, observou-se que as respostas não foram as mesmas, sendo o primeiro genotóxico e o segundo não genotóxico. Este resultado sugere que há diferenças na composição química entre as duas formas extrativas utilizadas.

Pelas análises realizadas por cromatografia, foi demonstrado que a quantidade de cumarina contida no macerado em etanol 80% é cerca de 55 vezes maior que no infuso das folhas de *M. glomerata*. Os picos de cumarina entre as duas formas extrativas analisadas mostraram diferença de 0,651 minutos, ainda que esta diferença possa ser aceitável para esse tipo de análise, em decorrência de uma possível variação na climatização do laboratório entre uma análise e outra.

Conforme apresentado pelos cromatogramas, onde ocorreu uma quantidade

diferente de picos para cada solução testada, pode-se constatar que a concentração dos componentes das duas soluções é realmente distinta. Contudo, apesar do cromatograma do macerado apresentar maior concentração de cumarina e um maior número de picos - e conseqüentemente, maior variedade de substâncias componentes - que o cromatograma do infuso, IM apresentou genotoxicidade na dose correspondente a 100% da IDR (IM 20), enquanto MM80 só apresentou tal efeito a partir da dose de 200% da IDR (MM80 10).

Em razão de ter sido empregada, neste estudo, uma linhagem celular que possui propriedades metabolizadoras (HTC) próprias de células de fígado de mamíferos, pode-se admitir que tanto essa contradição observada entre concentração e efeito como as diferenças entre os resultados obtidos tenham sido causadas não somente pelos componentes detectados nos chás, mas também causadas por substâncias resultantes da metabolização celular das substâncias químicas presentes nestes chás.

Ainda corroboram esta hipótese as observações de que IM10 apresentou resultados estatisticamente iguais a MM80 2,5 e MM80 5, apesar de estes últimos possuírem quantidade de cumarina, respectivamente, 13,76 e 27,5 vezes maior que aquele. Por sua vez, MM80 20, apresentou também uma quantidade de cumarina 27,5 vezes maior que IM40. Entretanto, comparando-se os respectivos escores médios, a quantidade de dano que provocou foi muito superior à quantidade causada por IM40. Neste mesmo teste do cometa, ainda observou-se que, mesmo com uma quantidade de cumarina 13,76 vezes maior, MM80 10 causou danos semelhantes ao provocado por IM40. A mesma diferença de cumarina foi encontrada entre MM80 5 e IM20. Contudo, neste caso, a maior genotoxicidade foi apresentada justamente pelo tratamento com menor quantidade dessa substância (IM20).

Por outro lado, no teste do micronúcleo, o único resultado que diferiu estatisticamente do controle PBS foi IM40. Neste teste, nem MM80 10, que apresenta quantidade de cumarina 13,76 maior, nem IM20, com quantidade de cumarina 2 vezes menor que IM40, apresentaram danos significativos.

Desta forma, com base nestes resultados, pode-se inferir que a quantidade de cumarina nas amostras não interferiu na quantidade de danos observada tanto no teste do cometa como no teste do micronúcleo. Deve-se assim admitir que outras substâncias podem ter sido responsáveis por produzir esses efeitos. Vale lembrar que pode haver ainda, tanto no infuso quanto no macerado em etanol 80%, substâncias não detectadas pelo método cromatográfico empregado, ou por não absorverem luz UV ou por absorverem luz UV com comprimento de onda diferente do utilizado no presente estudo.

Apesar de observações anteriores de que cumarinas presentes nas folhas *in natura* de *M. glomerata* são potenciais substâncias para o tratamento de câncer (LIN et al., 1996) com relatada atividade antitumoral (FÁTIMA et al, 2005), verificou-se neste trabalho que a cumarina presente no chá não foi a responsável direta pelas atividades genotóxica ou mutagênica demonstradas neste sistema, além disso também não houve indicação de que ela possua propriedade protetora contra danos induzidos pelo MMS no material genético de células HTC.

Com relação ao *Bidens pilosa*, a genotoxicidade do infuso nas três dosagens usadas no teste do cometa mostrou evidente relação dose-resposta, tanto em número de células danificadas quanto no escore de cometas, o que demonstra aumento acentuado na qualidade do dano ocorrido. O decocto apresentou genotoxicidade, mas com efeitos mais brandos se comparados à respectiva dosagem da infusão, além de não demonstrar uma relação de dose-dependência. A

menor genotoxicidade do decocto em relação à do infuso, especialmente nas duas concentrações mais elevadas, sugere distinção na composição química das duas formas de chás obtidos desta planta. Esta sugestão está amparada por Simões et al. (2001) que defendem que a decocção é uma técnica a ser empregada em número restrito de drogas, dado que muitos dos princípios ativos nelas existentes são alterados por um aquecimento prolongado.

Assim, para *B. pilosa* admite-se que a maior temperatura empregada na preparação do decocto pode ter provocado desnaturação ou inativação de algum princípio ativo da planta, causando assim diminuição de seu efeito. Por outro lado, para *M. glomerata*, uma vez que os cromatogramas de IM e MM80 demonstraram que a concentração de substâncias extraídas no primeiro foi muito inferior ao encontrado no segundo, admite-se que a maceração em etanol 80% é um processo mais eficiente para extração daquelas substâncias que absorvem UV no comprimento de onda utilizado na técnica de CLAE-UV.

Desta forma, pode-se sugerir que a diferença de genotoxicidade observada no teste do cometa, seja entre IM e MM80 seja entre IB e DB, demonstra a capacidade diferenciada de extração das técnicas empregadas.

No caso do estudo de *B. pilosa* pelo teste do micronúcleo, dentre as soluções testadas, nenhuma diferiu do resultado obtido no controle negativo. Mesmo IB40, que demonstrou grande genotoxicidade, teve resultado não significativo neste teste. Considerando que neste teste o único tratamento que causou diferenças significativas do controle PBS foi IM40 pode-se sugerir que os danos causados pelo infuso de *Bidens pilosa* (IB) têm natureza diferente dos causados pelo infuso de *M. glomerata* (IM). Valentin- Severin et al. (2003) ressaltam que a diferença entre os testes do cometa e do MN consiste basicamente na variação do tipo de alteração

detectada no DNA: teste do cometa detecta lesões primárias no DNA, freqüentemente reparáveis, enquanto teste do MN detecta lesões irreparáveis. Os danos detectados no teste de cometa, em pH alcalino, são principalmente quebras de fita simples, além de quebras de fita dupla, lesões álcali-lábeis e excisões indiretas promovidas por enzimas de reparo (VAMVAKAS; VOCK, 1997; SINGH et al., 1988; LOPEZ; VALVERDE, 1999). Assim, o infuso de *Mikania glomerata* (guaco) poderia estar causando danos não recuperáveis pelo sistema de reparo celular (SIMMONS; SNUSTAD, 2001) enquanto os danos induzidos pelo infuso de *Bidens pilosa* seriam reparáveis pela célula, com o que se poderia, inclusive, inferir que estes seriam principalmente quebras de fitas simples do DNA.

Apesar de ser reconhecida a presença de compostos fenólicos em *Bidens pilosa*, importantes na prevenção de diversas doenças (ROSE; KASUN, 2002), em especial a presença de quercetina, uma substância polifenólica com comprovada ação antioxidante *in vivo e in vitro* (WILMS et al, 2005; DUTHIE et al., 1997) e atividade anticarcinogênica (VAN ACKER et al., 1996), verificou-se neste trabalho que os chás desta planta mostraram atividade genotóxica.

Estas observações permitem sugerir que as formas extrativas utilizadas no presente estudo possuem, em sua composição, princípios ativos que neutralizaram os efeitos protetores da quercetina, no caso de *Bidens pilosa*. Simões et al. (2001) postulam que as condições de produção podem alterar a concentração das substâncias ativas, e por conseqüência, o efeito, a eficácia e a segurança terapêutica dos produtos fitoterápicos. Além disso, pode-se admitir ter ocorrido, durante a produção das formas extrativas testadas, além da inativação de princípios ativos, o surgimento de outras substâncias com efeitos danosos ao material genético, pois segundo Jagerstad e Skog (2005), o processamento de alimentos e o

cozimento a altas temperaturas têm demonstrado gerar vários tipos de substâncias genotóxicas.

Desta forma, os resultados do presente trabalho sugerem cuidados na utilização dessas plantas em preparações de consumo oral, uma vez que indicaram que nas doses mais elevadas (referentes a doses acima da IDR) ocorrem danos ao DNA mais significativos.

### **Considerações finais**

As informações obtidas no presente estudo demonstram que, mesmo com diversas propriedades terapêuticas, tanto *M. glomerata* quanto *B. pilosa* não estão isentas de efeitos nocivos, o que levanta a necessidade de cuidados na utilização das mesmas como fitoterápicos. A relação dose utilizada/efeito observado sugere, por sua vez, que a ingestão de grandes quantidades destas formas extrativas pode tornar-se prejudicial do ponto de vista genético, sobretudo para células já submetidas a uma condição de estresse, como no caso de algum processo patológico instalado, caso esses em que se costuma utilizar fitoterápicos na tentativa de cura.

Assim, convém ressaltar que, conforme demonstrado, a escolha da forma de preparo do fitoterápico tem uma importância muito relevante tanto no efeito desejado quando no efeito adverso sobre o DNA.

A necessidade de estudos adicionais se faz presente, a fim de esclarecer sobre quais seriam as condições de uso que poderiam oferecer os benefícios das propriedades terapêuticas dessas plantas sem colocar em risco a saúde da população humana.

## Referências bibliográficas

- ABAJO, C.; BOFFILL, M. A.; DEL-CAMPO, J.; MENDEZ, M. A.; GONZALEZ, Y.; MITJANS, M.; VINARDELL, M. P. ***In vitro* study of the antioxidant and immunomodulatory activity of aqueous infusion of *Bidens pilosa***. Journal of Ethnopharmacology, n. 93, p. 319 – 323, 2004.
- BALLARD, R. ***Bidens pilosa* complex (Asteraceae) in North and Central America**. American Journal of Botany, v.73, n.10, p.1452- 1465, 1986.
- BOTSARIS, S. A. **Fitoterapia Chinesa e Plantas Brasileiras**. Editora Cone, São Paulo,SP, 1995.
- BRANDÃO, M.G.L.; KRETTLI, A.U.; SOARES, L.S.R.; NERY, C.G.C.; MARINUZZI, H.C. **Antimalarial activity of extracts and fractions from *Bidens pilosa* and other *Bidens* species (Asteraceae) correlated with the presence of acetylene and flavonoid compounds**. Journal of Ethnopharmacology n. 57, 131–138, 1997.
- BRANDÃO, M.G.L.; NERY, C.G.C.; MAMÃO, M.A.S.; KRETTLI, A.U. **Two methoxylated flavone glycosides from *Bidens pilosa***. Phytochemistry 48, 397–399, 1998.
- CABRAL, L.M.; DOS SANTOS, T.C.; ALHAIQUE, F. **Development of a profitable procedure for the extraction of 2-H-1benzopyran-2- one (coumarin) from *Mikania glomerata***. Drug Dev Ind Pharm 27, 103–6. 2001.
- CELEGHINI R. M. S; VILEGAS J. H. Y.; LANÇAS F. M. **Extraction and quantitative HPLC analysis of coumarin in hydroalcoholic extracts of *Mikania glomerata* Sprengel (“guaco”) leaves**. J. Braz. Chem. Soc., vol. 12, n. 6, 706-709, 2001.
- DUTHIE, S.J.; COLLINS, A.R.; DUTHIE, G.G.; DOBSON V.L., **Quercetin and myricetin protect against hydrogen peroxide- induced DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) in human lymphocytes**. Mutation Research 393, 223–231,1997.
- FARMACOPÉIA PORTUGUESA**. 6 ed. Ed. Imprensa Nacional-Casa da Moeda,Lisboa, 1997.
- FÁTIMA, A. de; KOHN, L. K.; ANTÔNIO, M. A.; CARVALHO, J.E.; PILLI, R. A. **R-goniotha-lamin: total syntheses and cytotoxic activity against cancer cell lines**. Bioorganic & Medicinal Chemistry, v. 13, p. 2927-2933, 2005.
- FENECH, M. **The in vitro micronucleus technique**. Mutation Research, 455, p.81 – 95, 2000.
- FENECH, M. **The advantages and disadvantages of the cytokinesis block micronucleus method**. Mutation Research, 392, p. 11 – 18, 1997.

FERRARI, I. **Teste do micronúcleo em cultura temporária de linfócitos.** In: RABELLO-GAY, M. N., RODRIGUES, M. A. L. R., MONELEONE-NETO, R. **Mutagênese, teratogênese e carcinogênese: métodos e critérios de avaliação.** Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética/Revista Brasileira de Genética, p. 102 – 112, 1991.

FIERRO, I. M.; DA SILVA, A. C.; LOPES, C.; DE MOURA, R. S.; BARJA-FIDALGO, C. **Studies on the anti-allergic activity of *Mikania glomerata*.** Journal of Ethnopharmacology 66, p. 19–24, 1999.

GARRIOT, M. L.; PHELPS, J. B.; HOFFMAN, W. P. **A protocol for the in vitro micronucleus test I. Contributions to the development of a protocol suitable for regulatory submissions from an examination of 16 chemicals with different mechanisms of action and different levels of activity.** Mutation Research, n. 517, p. 123 – 134, 2002.

HOFFMANN B.; HÖLZL J. **Chalcone glucoside from *Bidens pilosa*.** *Phytochemistry* 28: 247–249, 1989.

HOLETZ, F. B.; PESSINI, G. L.; SANCHES, N. R.; CORTEZ, D. A. G.; NAKAMURA, C. V.; FILHO, B. P. D. **Screening of some plants used in the brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 97, p. 1027 – 1031, 2002.

JAGERSTAD, M.; SKOG, K. **Genotoxicity of heat-processed foods.** Mutation Research 574, 156–172, 2005.

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 Communication, v. 3, n. 2, p.103-115, 1995.

LASTRA VALDES, H. A. ***Bidens pilosa* Liné.** Revista Cubana Planta Medica, n. 1, p.28-33, 2001.

LIN, C. N.; LIOU, S. J.; LEE, T. H.; CHUANG, T. C.; WON, S. J. **Xanthones derivatives as potential anti-cancer drugs.** J. Pharm. Pharmacol., v.48, n.5, 539-544, 1996.

LOPEZ, R. E.; VALVERDE, M. **Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications.** Journal Chromatography Bulletin: Biomed. Sci. Appl. 722, 225–254, 1999.

MAIORANO, A. V.; MARCUSSI, S.; DAHER, M. A. F.; OLIVEIRA, C. Z.; COUTO, L. B.; GOMES, O. A.; FRANÇA, S.C. **Antiophidian properties of the aqueous extract of *Mikania glomerata*.** Journal of Ethnopharmacology, n. 102, p. 364 – 370, 2005.

OLIVEIRA F.; SAITO, M. L.; GARCIA, L. O. **Caracterização cromatográfica em camada delgada do extrato fluído de guaco— *Mikania glomerata* Sprengel.** LECTA-USF; 11, 43–56, 1993.

OLIVEIRA, F.Q.; ANDRADE-NETO, V.; KRETTLI, A. U.; BRANDÃO, M. G. L. **New evidences of antimalarial activity of *Bidens pilosa* roots extract correlated with polyacetylene and flavonoids.** Journal of Ethnopharmacology, n. 93, p. 39 – 42, 2004

RABE, R.; VAN STADEN, J. **Antibacterial activity of South African plants used for medicinal purposes.** Journal of Ethno- pharmacology 56, 81–87.1997.

RICE-EVANS, C.; MILLER, N.J.; PAGANGA, G. **Structure- antioxidant activity relationship of flavonoids and phenolic acids.** Free Radical Biology and Medicine 20, 933–956. 1996.

ROSE, J. A.; KASUM, C. M. **Dietary flavonoids: bioavalibility, metabolic effects, and safety.** Annual Review of Nutrition 22, 19–34, 2002.

SALVADORI, D. M. F.; RIBEIRO L. R.; NATARAJAN, A. T. **The anticlastogenicity of  $\beta$ -carotene evaluated on human hepatoma cells.** Mutation Research n. 303, p. 151 – 156, 1993.

SILVEIRA E SÁ, R. C.; LEITE, M. N.; REPOREDO, M. M.; ALMEIDA, R. N. **Evaluation of long-term exposure to *Mikania glomerata* (Sprengel) extract on male Wistar rats' reproductive organs, sperm production and testosterone level.** Contraception, n. 67, p. 327–331, 2003.

SIMMONS, M. J.; SNUSTAD, D. P. **Fundamentos de genética.** 2ed.Guanabara Koogan, 2001, 756p.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. (Orgs.) **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** Ed. UFRGS / Ed. UFSC, Porto Alegre/Florianópolis, 2001. 821p.

SINGH, N. P.; MCCOY, M. T.; TICE, R. R.; SCHNEIDER, E. L., **A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells.** Experimental Cell Research 175, 184–191, 1988.

SPEIT, G.; HANELT, S.; HELBIG, R.; SEIDEL, A.; HARTMANN, A. **Detection of DNA effects in human cells with the comet assay and their relevance for mutagenesis.** Toxicology Letters, n. 88, p 91–98, 1996.

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. ed. **Mehtods in molecular biology: DNA repair protocols – eukariotic systems.** Totowa: Humana Press, v. 113, p. 203–211, 1999.

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.

VAMVAKAS, E. H.; VOCK, W.K. L. **On the role of DNA double- strand breaks in toxicity and carcinogenesis.** *Critical Review of Toxicology* 27, 155–174, 1997.

VAN ACKER, S. A.; VAN DEN BERG, D. J.; TROMP, M. N.; GRIFFIOEN, D. H.; VAN BENNEKOM, W. P.; VAN DER VIJGH W. J; BAST, A. **Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids,** *Free Radic. Biol. Med.* 20, 331–342, 1996.

VASQUES, C. A. V.; VASQUES, N. V.; GELLER, M. **Revisão farmacognóstica do picão (*Bidens pilosa* L.).** *Arquivos Brasileiros de Medicina*, v.60, n.2, p.107-108, 1986.

WILMS L. C.; HOLLMAN, P. C. H.; BOOTS, A. W.; KLEINJANS, J. C. S. **Protection by quercetin and quercetin-rich fruit juice against induction of oxidative DNA damage and formation of BPDE-DNA adducts in human lymphocytes.** *Mutation Research* 582, 155–162, 2005.

## REFERÊNCIAS

ABAJO, C.; BOFFILL, M. A.; DEL-CAMPO, J.; MENDEZ, M. A.; GONZALEZ, Y.; MITJANS, M.; VINARDELL, M. P. **In vitro study of the antioxidant and immunomodulatory activity of aqueous infusion of *Bidens pilosa***. Journal of Ethnopharmacology, n. 93, p. 319 – 323, 2004.

ALVAREZ, A.; POMAR, F.; SEVILLA, M. A.; MONTERO, M. J. **Gastric antisecretory and antiulcer activities of an ethanolic extract of *Bidens pilosa* L. var. radiata Schult. Bip.** Journal of Ethnopharmacology, n. 67, P. 333 – 340, 1999.

BALLARD, R. ***Bidens pilosa* complex (Asteraceae) in North and Central America**. American Journal of Botany, v.73, n.10, p.1452- 1465, 1986.

BOTSARIS S. A. **Fitoterapia Chinesa e Plantas Brasileiras**. Editora Cone, São Paulo, SP, 1995.

BRANDÃO, M.G.L.; KRETTLI, A.U.; SOARES, L.S.R.; NERY, C.G.C.; MARINUZZI, H.C.. **Antimalarial activity of extracts and fractions from *Bidens pilosa* and other *Bidens* species (Asteraceae) correlated with the presence of acetylene and flavonoid compounds**. Journal of Ethnopharmacology 57, 131–138, 1997

BRANDÃO, M.G.L.; NERY, C.G.C.; MAMÃO, M.A.S.; KRETTLI, A.U. **Two methoxylated flavone glycosides from *Bidens pilosa***. Phytochemistry 48, 397–399, 1998.

BRUSICK, D. J. **Principles of genetic toxicology**. 2nd ed. New York: Plenum Press, 1987, 248 p.

CABRAL, L.M.; DOS SANTOS, T.C.; ALHAIQUE, F. **Development of a profitable procedure for the extraction of 2-H-1benzopyran-2- one (coumarin) from *Mikania glomerata***. Drug Dev Ind Pharm 27, 103–6. 2001.

CELEGHINI R. M. S; VILEGAS J. H. Y.; LANÇAS F. M. **Extraction and quantitative HPLC analysis of coumarin in hydroalcoholic extracts of *Mikania glomerata* Spreng. (“guaco”) leaves**. J. Braz. Chem. Soc., vol. 12, n. 6, 706-709, 2001.

CHANG – JUNG, S.; CHIANG LIEN,C.; LIU LI, T; WANG KUO,C.;LIN CHUN, C. **Antileukemic activity of *Bidens pilosa* L. var. minor (Blume) Sherff and *Houttuynia cordata***. American-Journal-of- Chinese-Medicine. n. 29, p. 303-312. 2001.

CORRÊA JÚNIOR, C.; MING, L.C.; SCHEFFER, M.C. **Cultivo de plantas medicinais, condimentares e aromáticas**. 2 ed., Jaboticabal:FUNEP,1994. 162p.

DIMO, T.; NGUELEFAKC, T. B.; TAN, P. V.; YEWAH, M.P.; DONGO, E.; RAKOTONIRINA, S. V.; KAMANYI, A.; BOPELET, M. **Possible mechanisms of action of the neutral extract from *Bidens pilosa* L. leaves on the cardiovascular system of anaesthetized rats**. Phytotherapy Research, n. 17, p. 1135 – 1139, 2003.

DUTHIE, S.J.; COLLINS, A.R.; DUTHIE, G.G.; DOBSON V.L. **Quercetin and myricetin protect against hydrogen peroxide- induced DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) in human lymphocytes**. Mutation Research 393, 223–231,1997.

FALCK, G.; CATALAN, J.; NORPPA, H. **Influence of culture time on the frequency and contents of human lymphocyte micronuclei without cytochalasin B**. Mutation Research, n. 147, p 29 – 36, 1985.

FAIRBAIN, D. W.; O' NEIL, K.L. **The neutral comet assay es suficiente to identify an apoptotic “window” by visual inspection**. Apoptosis n. 1 p. 91 – 94, 1996.

FARIAS, M. R.; SIMÕES, C. M. O.;et al. **Espécies vegetais empregadas na produção de fitoterápicos em Santa Catarina**. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL,12,1994, Fortaleza. Resumos Fortaleza,1994. p.125.

**FARMACOPÉIA PORTUGUESA**. 6ed. Ed. Imprensa Nacional-Casa da Moeda,Lisboa, 1997.

FÁTIMA, A. de; KOHN, L. K.; ANTÔNIO, M. A.; CARVALHO, J.E.; PLLI, R. A. **R-goniotha-lamin: total syntheses and cytotoxic activity against cancer cell lines**. Bioorganic & Medicinal Chemistry, v. 13, p. 2927-2933, 2005.

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

FENECH, M. **The advantages and disadvantages of the cytokinesis block micronucleus method.** Mutation Research, 392, p. 11 – 18, 1997.

FENECH M, MORLEY AA. **Measurement of micronuclei in lymphocytes**  
**Measurement of micronuclei in lymphocytes.** Mutation Research. 1985 Feb-Apr;147(1-2):29-36.

FERRARI, I. **Teste do micronúcleo em cultura temporária de linfócitos.** In: RABELLO-GAY, M.N., RODRIGUES, M.A.L.R. & MONELEONE-NETO, R. **Mutagênese, teratogênese e carcinogênese: métodos e critérios de avaliação.** Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética/Revista Brasileira de Genética, p. 102 – 112, 1991.

FIERRO, I. M.; DA SILVA, A. C.; LOPES, C.; DE MOURA, R. S.; BARJA-FIDALGO, C. **Studies on the anti-allergic activity of *Mikania glomerata*.** Journal of Ethnopharmacology 66, p. 19–24, 1999.

GARRIOT, M. L.; PHELPS, J. B.; HOFFMAN, W. P. **A protocol for the in vitro micronucleus test I. Contributions to the development of a protocol suitable for regulatory submissions from an examination of 16 chemicals with different mechanisms of action and different levels of activity.** Mutation Research, n. 517, p. 123 – 134, 2002.

GATEHOUSE, D. G. **Bacterial mutation assays.** In: KIRKLAND, D. J. **Basic mutagenicity tests.** New York: Cambridge University Press, 1990. p. 13-50.

HEDDLE, J. A. **Measurement of chromosomal breakage in cultured cells by the micronucleus technique.** In: Evans, H.J. and Lloyd, D.C. (Eds), **Mutation-induced chromosome damage to man,** Edinburgh University Press, pp. 191 – 200, 1976.

HOFFMANN B.; HÖLZL J. **Chalcone glucoside from *Bidens pilosa*.** *Phytochemistry* 28: 247–249, 1989.

HOLETZ, F. B.; PESSINI, G. L.; SANCHES, N. R.; CORTEZ, D. A. G.; NAKAMURA, C. V.; FILHO, B. P. D. **Screening of some plants used in the brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 97, p. 1027 – 1031, 2002.

JAGERSTAD, M.; SKOG, K. **Genotoxicity of heat-processed foods.** Mutation Research 574, 156–172, 2005.

KIRSCH-VOLDERS, M. & FENECH, M. **Inclusion of micronuclei in non-divided mononuclear lymphocytes and necrosis/apoptosis may provide a more comprehensive cytokinesis block micronucleus assay for biomonitoring purposes.** *Mutagenesis*, v.16, n.1, p. 51 – 58, 2001.

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.*, v. 3, n.2, p.103-115.1995.

KUSANO, A.; SEYAMA, Y.; USAMI, E.; KATAYSE, T.; SHIBANO, M. **Studies on the antioxidant active constituents of the dried powder from *Bidens pilosa* L. var. *radiata*.** *Natural- Medicines*. n. 57, p100-104. June 2003.

LASTRA VALDES, H. A. ***Bidens pilosa* Liné.** *Rev Cubana Planta Med*, n. 1, p.28-33, 2001.

LIN, C. N.; LIOU, S. J.; LEE, T. H.; CHUANG, T. C.; WON, S. J. **Xanthones derivatives as potential anti-cancer drugs.** *J. Pharm. Pharmacol.*, v.48, n.5, 539-544, 1996.

LOPEZ, R. E.; VALVERDE, M. **Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications.** *Journal Chromatography Bulletin: Biomed. Sci. Appl.* 722, 225–254, 1999.

MAIORANO, A. V.; MARCUSSI, S.; DAHER, M. A. F.; OLIVEIRA, C. Z.; COUTO, L. B.; GOMES, O. A.; FRANÇA, S.C. **Antiphidial properties of the aqueous extract of *Mikania glomerata*.** *Journal of Ethnopharmacology*, n. 102. p. 364 – 370, 2005.

MARTINS, E. R.; DE CASTRO, D.M.; CASTELLANI, D. C.; DIAS, J. E. **Plantas medicinais.** Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1995. 220 p.

MATTER, B. SCHMID, W. **Trenimon-induced chromosomal damage in bone-marrow cells of six mammalian species, evaluated by the micronucleus test.** *Mutation Research/ Fundamental and molecular mechanisms of mutagenesis*. Aug: 12 (4):417-25 1971.

MERSCH, J.; BEAUVAIS, M.; NAGEL, P. **Induction of micronuclei in haemocytes and gill cell of zebra mussels, *Dreissena polymorpha*, exposed to clastogens.** *Mutation Research*, n. 371, p. 47 – 55, 1996.

ODIN, A. P. **Vitamins as antimutagens: advantages and some possible mechanisms of antimutagenic action.** Mutation Research. n. 386, p. 39 – 67, 1997.

OLIVE, P. L.; WLODEK, D.; DURAND, R. E.; BANÁTH, P. **Factors influencing DNA migration from individual cells subjected to gel eletrophoresis.** Exper. Cell Res., n.198, 259 – 267, 1992.

OLIVEIRA F.; SAITO M. L.; GARCIA, L. O. **Caracterização cromatográfica em camada delgada do extrato fluído de guaco— *Mikania glomerata* Sprengel.** LECTA-USF; 11, 43–56, 1993.

OLIVEIRA, F. Q.; ANDRADE-NETO, V.; KRETTLI, A. U.; BRANDÃO, M. G. L. **New evidences of antimalarial activity of *Bidens pilosa* roots extract correlated with polyacetylene and flavonoids.** Journal of Ethnopharmacology, n. 93, p. 39 – 42, 2004.

OLIVEIRA, J. M.; JORDAO, B.Q.; RIBEIRO, L.R.; EIRA, A. F.; MANTOVANI, M.S. **Anti-genotoxic effect of aqueous extracts of sun mushroom (*Agaricus blazei* Murill lineage 99/26) in mammalian cells in vitro.** Food and Chemical Toxicology 40 1775– 178, 2002.

PLANTAMED. Disponível em: <[www.plantamed.com.br](http://www.plantamed.com.br)>. Acesso em: 01 mar. 2004.  
PRISTA, L. N.; ALVES, A. C.; MORGADO, R. **Técnica farmacêutica e farmácia galênica vol I**, 3ed. Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, 1981.

PHELPS, J. B.; GARRIOT, M. L.; HOFFMAN, W. **A protocol for the in vitro micronucleus test II. Contributions to the validation of a protocol suitable for regulatory submissions from an examination of 10 chemicals with different mechanisms of action and different levels of activity.** Mutation Research, n. 521, p. 103 – 112, 2002.

RABE, R.; VAN STADEN, J. **Antibacterial activity of South African plants used for medicinal purposes.** Journal of Ethno- pharmacology 56, 81–87.1997.

RABELLO GAY, M. N.; RODRÍGUEZ, M. A. R.; MONTELEONE NETO, R. **Mutagênese, teratogênese e carcinogênese: métodos e critérios de avaliação.** Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto, SP, p. 96, 1991.

RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M.; FENECH, M. **Teste do micronúcleo em células humanas in vitro**. In: **Mutagênese ambiental**. Org: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M.; MARQUES, E. K. Canoas: ed. Ulbra. 2003, 355p.

RICE-EVANS, C.; MILLER, N.J.; PAGANGA, G. **Structure- antioxidant activity relationship of flavonoids and phenolic acids**. *Free Radical Biology and Medicine* 20, 933–956. 1996.

ROSE, J. A.; KASUM, C. M. **Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety**. *Annual Review of Nutrition* 22, 19–34, 2002.

SALVADORI, D. M. F.; RIBEIRO L. R.; NATARAJAN, A. T. **The anticlastogenicity of  $\beta$ -carotene evaluated on human hepatoma cells**. *Mutation Research* n. 303, p. 151 – 156, 1993.

SILVEIRA E SÁ, R. C.; LEITE, M. N.; REPOREDO, M. M.; ALMEIDA, R. N. **Evaluation of long-term exposure to Mikania glomerata (Sprengel) extract on male Wistar rats' reproductive organs, sperm production and testosterone level**. *Contraception*, n. 67, p. 327 –331, 2003.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. (Orgs.) **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Ed. UFRGS / Ed. UFSC, Porto Alegre/Florianópolis, 2001. 821p.

SIMMONS, M. J.; SNUSTAD, D. P. **Fundamentos de genética**. 2ed. Guanabara Koogan, 2001, 756p.

SINGH, N. P.; McCOY, M.T.; TICE, R.R.; SCHNEIDER, E. L. 1988. **A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells**. *Experimental cell research* 175: p 184-191.

SPEIT, G.; HANELT, S.; HELBIG, R.; SEIDEL, A.; HARTMANN, A. **Detection of DNA effects in human cells with the comet assay and their relevance for mutagenesis**. *Toxicology Letters*, n. 88, p 91 – 98, 1996.

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. ed. **Methods in molecular biology: DNA repair protocols – eukariotic systems**. Totowa: Humana Press, v. 113, p. 203 – 211, 1999.

TICE, R. R. **The single cell gel/cometa assay: a microgel electrophoretic technique for the detection of DNA damage and repair in individual cells.** In: *Environment Mutagenesis* (Philips, D. H. and Venitt, S., eds.), Bios Scientific Publishers LTD, Oxford, UK, p. 315 – 339, 1995.

TITENKO-HOLLAND, N.; WINDHAM, G.; KOLACHANA, P.; REINISCH, F.; PARVATHAM, S.; OSORIO, A. M.; SMITH, M.T. **Genotoxicity of malathion in human lymphocytes assessed using the micronucleous assay *in vitro* and *in vivo*: a study of malathion-exposed workers.** *Mutation research*, 338: 85 – 95, 1997.

TRICHOPOULOU, A.; KATSOUYANNI, K.; STUVER, S.; TZALA, L. GNARDELLIS, C.; RIMM, E.; TRICHOPHOULOS, D. **Consumption of olive oil and especific food groups in relation to breast cancer risk in Greece.** *J. Natl. Cancer I.*, n.87. p. 110 – 116. 1995.

TROSKO, J. E. **Challenge to the simple paradigma that “carcinogenens” are “mutagens” and to the *in vitro* and *in vivo* assays used to test the paradigm.** *Mutation Research*, n. 373, p. 245 – 249, 1995.

TUCKER, J. D.; PRESTON, R. J. **Chromosome aberrations, micronuclei, aneuploidy, sister chromatid exchanges and cancer risk assessment.** *Mutation Research*, n. 365, p. 147 – 159, 1996.

USA. U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES. FDA. **TOXICOLOGY AND CARCINOGENESIS STUDIES OF COUMARIN.** Washington, 1993.

USA. U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES. FDA. **TOXICOLOGY AND CARCINOGENESIS STUDIES OF QUERCETIN.** Washington, 1992.

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.

VAMVAKAS, E. H.; VOCK, W.K. L. **On the role of DNA double- strand breaks in toxicity and carcinogenesis.** *Critical Review of Toxicology* 27, 155–174, 1997.

VAN ACKER, S. A.; VAN DEN BERG, D. J.; TROMP, M. N.; GRIFFIOEN, D. H.; VAN BENNEKOM, W. P.; VAN DER VIJGH W. J; BAST, A. **Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids**, Free Radic. Biol. Med. 20, 331–342, 1996.

VILEGAS, J.H.Y.; DE MARCHI, E.; LANCAS, F.M. **Extraction of low- polarity compounds (with emphasis on coumarin and kaurenoic acid) from *Mikania glomerata* (Guaco) leaves**. Phytochemical Analysis 8, 266–270, 1997.

VASQUES, C.A.V.; VASQUES, N.V.; GELLER, M. **Revisão farmacognóstica do picão (*Bidens pilosa* L.)**. Arquivos Brasileiros de Medicina, v.60, n.2, p.107-108, 1986.

WATERS, M. D.; BRADY, A. L.; STACK, H. F.; BROCKMAN, H.E. **Antimutagenicity profiles for some model compounds**. Mutat. Res., n.238, p. 57 – 85, 1990.

WILMS L. C.; HOLLMAN, P. C. H.; BOOTS, A. W.; KLEINJANS, J. C. S. **Protection by quercetin and quercetin-rich fruit juice against induction of oxidative DNA damage and formation of BPDE-DNA adducts in human lymphocytes**. Mutation Research 582, 155–162, 2005.

YI-MING C.; DA-YUNG C.; SHENG-YANG W.; YUEH-HSIUNG K.; PI- WEN T; LIE-FEN S. **Metabolite profiling and chemopreventive bioactivity of plant extracts from *Bidens pilosa***. Journal of Ethnopharmacology, 95, 409–419, 2004.