



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

JULIANA MARA SERPELONI

**AVALIAÇÃO *IN VIVO* E *IN VITRO* DA CITOTOXICIDADE,
GENOTOXICIDADE E DOS EFEITOS PROTETORES DE
EXTRATOS DE PLANTAS MEDICINAIS DO CERRADO
BRASILEIRO**

Londrina
2008

JULIANA MARA SERPELONI

**AVALIAÇÃO *IN VIVO* E *IN VITRO* DA CITOTOXICIDADE,
GENOTOXICIDADE E DOS EFEITOS PROTETORES DE
EXTRATOS DE PLANTAS MEDICINAIS DO CERRADO
BRASILEIRO**

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

Orientador: Profª. Dra. Ilce Mara de Syllos Cólus

Londrina
2008

JULIANA MARA SERPELONI

**AVALIAÇÃO *IN VIVO* E *IN VITRO* DA CITOTOXICIDADE,
GENOTOXICIDADE E DOS EFEITOS PROTETORES DE
EXTRATOS DE PLANTAS MEDICINAIS DO CERRADO
BRASILEIRO**

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

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Ilce Mara de Syllos Cólus
Departamento de Biologia Geral CCB-UEL

Profa. Dra. Lusânia Maria Greggi Antunes
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão
Preto – USP

Profa. Dra. Sílvia Helena Sofia
Departamento de Biologia Geral CCB-UEL

Londrina, 15 de fevereiro de 2008.

APOIO FINANCEIRO
Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)
Universidade Estadual de Londrina
Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

Dedico este trabalho aos meus
pais e ao meu avô Octávio

AGRADECIMENTOS

A Deus, por perdoar meu descaso, por entender as tempestades que passei durante o último ano e os motivos que tive para discordar e reclamar. Obrigada por manter ao meu lado as pessoas que eu amo e que são importantes para mim e, principalmente, por ter ensinado o valor que devo dar a cada uma delas.

À minha família. Aos meus pais, Paulino e Edna, que sempre me deram a oportunidade de estudar. Obrigada por me ensinarem os valores que eu tenho e perdão por não ter aprendido tudo que se dispuseram a me ensinar. Eu quero conseguir ser ao menos metade de tudo que vocês são prá mim. À minha irmã Jamile, pelas roupas fornecidas durante a faculdade e o mestrado. E ao meu avô, corintiano doente como eu, que é quem mais se empolga sempre com tudo que eu faço e conquisto e prá quem eu prometi que ainda vou ser “doutora”.

À Prof.^a Dr.^a Ilce Mara de Syllos Cólus, minha orientadora, amiga e mãezona, por me entender, por se preocupar e por saber a hora de dizer: “Pode tirar uma semaninha de folga”. Obrigada chefe, por me mostrar que eu posso muito mais do que eu me julgo capaz e por depositar em mim tanta confiança nesses quase cinco anos juntas.

Às minhas amigas do coração, Camila, Ju Carneiro, Leandra e Mazzuck’s por serem, de perto ou de longe, a fortaleza prá onde eu corro sempre que preciso de colo. Obrigada por permanecerem ao meu lado apesar do meu jeito hiperbólico de ser.

Aos meus priminhos do coração, Otávio e Erika, por me atenderem no telefone quando eu ligo pedindo um milhão de coisas. Obrigada por serem bem mais que meus primos.

Aos amigos de São Martinho. À Carolina (Lolo) minha amiga-mãe, que sem saber me deu o conforto tantas vezes, a Beatriz. Ao Paulo, Alvinho, Régis e Gustavo, que dizem que eu sou louca, que estudo demais, mas estão sempre do meu lado (ou eu que não os deixo em paz). Obrigada pela bendita cerveja que alivia qualquer stress.

Ao meu time do coração, CORINTHIANS, por todas as alegrias e também por algumas tristezas. Obrigada por dar ao corintiano o prazer de ser corintiano e berrar, até na segunda divisão: “*Corinthians, eu nunca vou te abandonar porque eu te amo*”.

Aos amigos e amigas de laboratório que foram mais que parceiros esses anos: Hellen e Iara (parceiras sempre nas cervejadas), Roberta (pelas caronas ao shopping, DVDs, livros e etc), Nathália, Priscilla e Karina. Em especial à Mariana minha amiga e parceira e ao Mateus (amante do álcool 70% e do lisoforme) por entender a minha ignorância quando comecei a trabalhar *in vitro*. Um ultra, maxi, mega, power obrigada a todos, pois sem vocês meu trabalho não seria nada.

Aos amigos que passaram do laboratório para a minha vida. Ao Gustavo Barcelos, pelo apoio profissional, emocional e discrepacional. Em especial, ao “core”, meu amigo José Pedro, por não desistir nunca de tentar enfiar tanta coisa nessa minha cabeça dura e, principalmente, por me ouvir sempre, nas alegrias e nas tristezas.

Aos membros da comissão examinadora, Profa. Dra. Lusânia Maria Gregg Antunes e Profa. Dra. Sílvia Helena Sofia, pela contribuição na finalização desse trabalho.

Aos Professores da UNESP, Prof. Dr. Wagner Vilegas e Prof^ª. Dr^ª. Eliana Aparecida Varanda, pelo fornecimento dos extratos e pela parceria no projeto Biota-FAPESP.

Aos técnicos Carlinhos, Dário e Melissa. À Sueli, pela paciência em atender os alunos perdidos e ao Departamento de Biologia Geral e Biotério Central da UEL.

Às florestas que eu desmatei imprimindo essa dissertação.

E por fim, a todos aqueles que, de alguma forma, me ajudaram ou me atrapalharam. Nunca me esquecerei de vocês.

Muito Obrigada!!!

“A maravilhosa disposição e harmonia do universo só pode ter tido origem segundo o plano de um Ser que tudo sabe e tudo pode. Isto fica sendo a minha última e mais elevada descoberta” (Isaac Newton).

SERPELONI, Juliana Mara. **Avaliação *in vivo* e *in vitro* da citotoxicidade, genotoxicidade e dos efeitos protetores de extratos de plantas medicinais do cerrado brasileiro.** 2008. 119f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2008.

RESUMO

O uso de plantas para fins terapêuticos tem aumentado consideravelmente, assim como a crença de que elas possuem apenas efeitos benéficos e são livres de efeitos colaterais ou adversos. No entanto, a maioria das informações disponíveis sobre o consumo dessas plantas não tem nenhum suporte científico e seu uso é baseado somente na cultura popular. Entre as plantas usadas pela humanidade como fontes de medicamentos estão aquelas pertencentes ao gênero *Miconia*. Estudos têm mostrado que extratos de *Miconia* apresentam efeitos analgésicos, são ativos contra formas tripomastigotas de *Trypanosoma* e que Primin, um antibiótico extraído de *Miconia* sp., apresentou forte ação antineoplásica. Embora diversas atividades biológicas de extratos de *Miconia* tenham sido reportadas, nenhum estudo sobre seus efeitos no DNA (indução, redução ou prevenção de mutações) está disponível atualmente. O objetivo do presente estudo foi avaliar os potenciais citotóxico, genotóxico e mutagênico de quatro extratos de espécies do gênero *Miconia* e também os seus possíveis efeitos protetores contra os danos no DNA induzidos pelos quimioterápicos ciclofosfamida e doxorrubicina utilizados, respectivamente, em testes agudos *in vivo* e *in vitro*. Os testes empregados *in vivo* foram o ensaio cometa e o teste do micronúcleo em células de camundongos. Para a avaliação da genotoxicidade, três concentrações foram testadas, 200, 400 e 540 mg/kg p.c., baseadas no limite de solubilidade dos extratos em água destilada, e para os efeitos protetores, somente a maior dose foi avaliada contra 40 mg/kg p.c. de ciclofosfamida. Para a análise *in vitro* da citotoxicidade foi empregado o ensaio clonogênico em culturas de fibroblastos de hamster Chinês (V79). A partir dos resultados obtidos foram escolhidas as três menores concentrações não citotóxicas a serem utilizadas para as avaliações da mutagenicidade e antimutagenicidade dos extratos. As culturas foram tratadas com as diferentes concentrações dos extratos (teste de mutagenicidade) ou com o extrato associado à doxorrubicina 1 µg/mL (teste de antimutagenicidade) em protocolos de pré, pós e tratamento simultâneo. Todos os extratos induziram alterações na migração do DNA (ensaio do cometa) *in vivo*. Tanto *in vivo* quanto *in vitro*, resultados negativos para mutagenicidade e positivos quanto aos efeitos protetores foram observados em todos os grupos de tratamento. Esses efeitos podem ser explicados devido aos constituintes químicos presentes nos extratos. Os principais constituintes isolados foram flavonóides, taninos e compostos fenólicos, todos eles com atividade antioxidante descrita na literatura. O efeito aditivo e sinérgico desses fitoquímicos em frutos e vegetais tem sido proposto como sendo responsável pela sua potente atividade antioxidante e anticâncer. Embora efeitos mutagênicos não tenham sido vistos, investigações posteriores devem ser feitas para garantir a segurança desses resultados, uma vez que efeito genotóxico moderado foi encontrado nos estudos *in vivo*. Os efeitos protetores detectados também encorajam novos estudos com esses extratos.

Palavras-chave: Mutagenicidade. Citotoxicidade. Efeitos protetores. *Miconia*. Células V79. Camundongo.

SERPELONI, Juliana Mara. ***In vivo and in vitro* evaluation of the cytotoxicity, genotoxicity and of the protective effects of extracts from medicinal plants of the brazilian cerrado**. 2008. 119p. Dissertation (Master's Degree in Genetics and Molecular Biology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2008.

ABSTRACT

The use of plants for healing purposes is becoming increasingly popular, as soon as they are believed to be beneficial and free of side effects. However, most of information available on several medicinal herbs does not have any scientific supporting data and their use as medicaments is based simply on traditional folk. Among the plants used by the humanity as a source of medicine are those that belong to *Miconia* genus. Studies have shown that *Miconia* extracts have analgesic effects, they were active against blood trypomastigote forms of *Trypanosoma* and Primin, an antibiotic extracted from *Miconia* sp., presented strong antineoplastic action. Although several biological activities of *Miconia* species had been reported, no study concerning their effects on DNA (induction, reduction or prevention of mutations) has been available until the present time. The aim of the present study was to assess the cytotoxic, genotoxic and mutagenic potential of extracts from four *Miconia* species and also the possible protective effects of these species against the damage induced on DNA by chemotherapeutics cyclophosphamide and doxorubicin using, respectively, in acute *in vivo* and *in vitro* tests. The tests employed *in vivo* were comet assay and micronucleus test in mice cells. For the genotoxic evaluation, three concentrations were tested, 200, 400 and 540 mg/kg b.w., based on the solubility limit of the extract in distilled water, and for the protective effects, only the higher dose was evaluated against 40 mg/kg b.w. of cyclophosphamide. For the *in vitro* analysis of cytotoxicity, the clonogenic assay was used in cultures of Chinese hamster lung fibroblasts (V79). From the obtained results, the three lowest no citotoxic concentrations were chosen to be used for the evaluations of the extracts mutagenicity and antimutagenicity. The cultures were treated with different concentrations of the extracts (mutagenicity test) or with the extract associated with doxorubicin at 1 µg/mL (antimutagenicity test) in protocols of pre, post and simultaneous treatment. All the extracts induced alterations in DNA migration (comet assay) *in vivo*. Both *in vivo* as *in vitro*, negative results for mutagenicity and positive results about the protective effects were observed for all of the treatment groups. These effects can be explained due to the chemical constituents present in the extracts. The main constituents isolated were flavonoids, tannins and phenolic compounds, all of them with antioxidant activity described in the literature. The additive and synergistic effects of these phytochemicals in fruit and vegetables also have been proposed as being the responsible for their potent antioxidant and anticancer activities. Although mutagenic effects were not seen, further investigations should be made to guarantee the security of these results, since a moderate genotoxic effect was found in the *in vivo* studies. Also the protective effect detected has encouraged new studies regarding these extracts.

Keywords: Mutagenicity. Cytotoxicity. Protective effects. *Miconia*. V79 cells. Mice.

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

- Figura 1** –Classificação dos fitoquímicos de ocorrência natural. Modificado de Liu (2003) 19
- Figura 2** –*Miconia albicans* (Sw.) Steud (fonte: www.bdt.fat.org.br)..... 23
- Figura 3** –*Miconia cabucu* Hoehne (fonte: www.bdt.fat.org.br) 23
- Figura 4** –*Miconia rubiginosa* (Bonpl.) (fonte: www.flmnh.ufl.edu/melastomes)..... 24
- Figura 5** –*Miconia stenostachya* D.C (fonte: www.bdt.fat.org.br) 24
- Figura 6** –*Guapira noxia* (Netto) Landell (fonte: www. arboretto.blogspot.com) 25
- Figura 7** –(A e B): Fotomicrografia de células micronucleadas de camundongos. A: células da medula óssea coradas com Giemsa (MNPCEs). B: células do sangue periférico coradas com laranja de acridina (MNRETs). As setas indicam os micronúcleos. Aumento original: 100X..... 27
- Figura 8** –Fotomicrografia de fibroblasto de hamster Chinês (V 79) binucleada com micronúcleo corada com Giemsa. Aumento original: 100X..... 28
- Figura 9** –Fotomicrografias de nucleóides corados com brometo de etídeo. Classificação dos danos no DNA no teste do Cometa. Cedido por Vanzela, T.P. Aumento original: 100X..... 30

ARTIGO 1

- Figure 1** – Percentage of damage reduction offered by the extracts in the presence of the cyclophosphamide calculated according to the formula of Manoharan and Banerjee (23) and Waters et al. (24). The parameters shown are the average score, frequency of damaged cells and frequency of MNRET..... 60

ARTIGO 3

Figura 1 –Etapas de preparação dos extratos para análise por HPLC-UV-DAD (RODRIGUES et al., 2007).....	96
--	----

ARTIGO 4

Figure 1 –Percentage surviving fraction of colonies formed (Y axis) after treatment with different concentrations of the methanolic extracts (X axis) from: (a) <i>Miconia stenostachya</i> , (b) <i>Miconia cabucu</i> , (c) <i>Miconia albicans</i> and (d) <i>Miconia rubiginosa</i>	115
---	-----

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1

- Table I** – Detection of DNA damage using the comet assay of 100 white blood cells per mice (n=10 animals per group) exposed to water, Tween 8%, CPA and plant extracts of *Miconia* species and sampled at 24 hours (mean \pm standard deviation) 61
- Table II** – Frequency of MNRETs for a total of 1000 analyzed cells per animal in each acute treatment to evaluate the mutagenicity of three different doses of the extracts of *Miconia* species and their positive and negative control groups 62
- Table III** – Detection of DNA damage using the comet assay of 100 white blood cells per mice (n=10 animals per group) exposed to water, Tween 8%, CPA and vegetal extracts of *Miconia* species associated with CPA and sampled at 24 hours (mean \pm standard deviation) 63
- Table IV** – Frequency of MNRETs in a total of 1000 analyzed cells per animal in each acute treatment to evaluate the antimutagenicity of the extracts of *Miconia* species and their positive and negative control groups 64

ARTIGO 2

- Table 1** – Mass of the extract obtained from the species studied 77
- Table 2** – Phytochemical screening of the species studied 77
- Table 3** – Polychromatic micronucleated erythrocytes (MNPCEs) from bone marrow, per 2000 analyzed cells, after the acute treatment (30 hours) with the different doses of the *Guapira* and *Indigofera* extracts and their positive and negative groups 78

ARTIGO 3

- Tabela 1** – Quantidade de massa obtida após maceração das folhas das espécies estudadas 94

Tabela 2 – Número médio de MNPCEs em um total de 2000 células analisadas por animal por tratamento para a avaliação dos efeitos protetores de diferentes extratos de plantas do gênero <i>Miconia</i>	95
--	----

ARTIGO 4

Table 1 – Micronucleus (MN) frequencies and Nuclear Division Index (NDI) observed in V79 cells submitted to treatment with different concentrations of <i>Miconia</i> methanolic extracts and its respective controls	116
Table 2 – Micronucleus (MN) frequencies, Nuclear Division Index (NDI) and Reduction Percentage (%R) observed in V79 cells submitted to pre-treatment, simultaneous and post-treatment with different concentrations of <i>Miconia</i> extracts associated with doxorubicin (DXR) and its respective controls	117

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 MUTAGÊNESE: RELEVÂNCIA EVOLUTIVA E RELAÇÃO COM O CÂNCER.....	15
1.2 ANTIMUTAGÊNESE E ANTICARCINOGÊNESE.....	16
1.3 QUIMIOPREVENÇÃO E O USO DE FITOQUÍMICOS	18
1.4 PLANTAS MEDICINAIS E O PROJETO BIOTA.....	20
1.4.1 “Programa Biota/Fapesp, O Instituto Virtual da Biodiversidade”	20
1.4.2 Plantas Medicinais e o Gênero <i>Miconia</i>	21
1.4.3 Gêneros <i>Indigofera</i> e <i>Guapira</i>	24
1.5 TESTE DO MICRONÚCLEO	26
1.5.1 Teste do Micronúcleo em Células da Medula Óssea e Sangue Periférico de Camundongos	26
1.5.2 Teste do Micronúcleo in vitro com Bloqueio de Citocinese	28
1.6 ENSAIO COMETA.....	30
2 OBJETIVOS	32
2.1 OBJETIVO GERAL	32
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	32
REFERÊNCIAS	33
3 EXPERIMENTOS <i>IN VIVO</i>	41
3.1 ARTIGO 1	42
3.2 ARTIGO 2	65
3.3 ARTIGO 3	79
4 EXPERIMENTOS <i>IN VITRO</i>	97
4.1 ARTIGO 4	98
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	118

1 INTRODUÇÃO

1.1 MUTAGÊNESE: RELEVÂNCIA EVOLUTIVA E RELAÇÃO COM O CÂNCER

Um gene carrega informações biológicas que devem ser precisamente copiadas e transmitidas de cada célula para toda sua prole. Vários mecanismos de revisão são usados para eliminar nucleotídeos incorretamente posicionados e permitir que a molécula de DNA seja copiada com menos de um erro em 10^9 nucleotídeos adicionados (ALBERTS et al., 2004). No entanto, além da sua função genotípica de replicação, o DNA apresenta ainda a função fenotípica de ditar o crescimento e a diferenciação do organismo e a sua função evolutiva, relacionada à mutação (SNUSTAD; SIMMONS, 2001).

Mutações são modificações súbitas e hereditárias no conjunto gênico de um organismo que não são explicáveis pela recombinação da variabilidade genética pré-existente (ZAHA, 1996). A produção de um mutante requer então, que ocorra uma mudança na seqüência de bases do DNA. Para isso existem vários mecanismos distintos, dentre eles, as substituições, adições ou deleções de bases durante a replicação; mudanças de bases resultantes de instabilidade química inerente às bases ou da ligação N-glicosídica e alterações que resultam da ação de outras substâncias e agentes ambientais sobre a molécula (MALACINSKI, 2005).

Além de ser um fenômeno raro, as mutações são também casuais, e por esta razão, elas não ocorrem para fornecer ao organismo uma maior adaptação e, sozinhas, não são capazes de determinar o processo evolutivo. É também o único processo envolvido na criação de variabilidade genética, ou seja, surgimento de novos alelos em uma população (RAMALHO; SANTOS; PINTO, 2004).

As mutações contribuem para a variação genética de um organismo, e são igualmente importantes para o geneticista, na compreensão de processos básicos. Sem as mutações não haveria variação disponível para compreensão do comportamento gênico e para uma visão dos processos bioquímicos básicos que envolvem fenômenos como a expressão gênica e o desenvolvimento (BURNS; BOTTINO, 1991). Todos os alelos existiriam apenas em uma forma e, portanto, análises genéticas não seriam possíveis.

Apesar dessa grande relevância evolutiva, é certo que as mutações em células somáticas estão também envolvidas no processo de carcinogênese e apresentam papel

relevante na patogênese de doenças crônicas degenerativas, tais como, arteriosclerose e doenças do coração, que são as principais causas de morte na população humana (DE FLORA et al., 1996). Mutações em células germinativas, por sua vez, podem resultar em proles defeituosas e abortos (MALLING, 2004). Análises cromossômicas de embriões provenientes de abortos espontâneos indicam que 50% deles contêm anormalidades genéticas (NATARAJAN, 2002).

O mais aceito paradigma da carcinogênese é o processo de acúmulo de lesões genéticas. Essas alterações modificam as funções normais dos genes supressores tumorais e ativam inadequadamente os proto-oncogenes, levando à formação de tumores, ou seja, ao fenótipo maligno (DIAZ, 2005). A suscetibilidade individual ao câncer envolve fatores como mudanças na expressão desses oncogenes e supressores tumorais, além de diferenças em genes específicos que regulam a ação de enzimas metabólicas e de reparo do DNA (WÜNSCH; ZAGO, 2005). Aliados a esses aspectos genéticos, estudos epidemiológicos estimam que cerca de 80% dos cânceres estão relacionados a fatores ambientais e estilo de vida, como o hábito de fumar, o ambiente de trabalho e a exposição aos constituintes da dieta (HATAGIMA, 2002).

As pesquisas com produtos, de origem natural ou sintética, que possam ter propriedades antimutagênicas ou anticarcinogênicas têm aumentado nos últimos anos. O descobrimento de produtos que reduzem a taxa de mutações diminuiria a incidência de câncer e outras doenças degenerativas.

1.2 ANTIMUTAGÊNESE E ANTICARCINOGENESE

O fenômeno da antimutagênese foi primeiro descoberto por Aaron Novick e Leo Szilard em 1952, quando observaram que um aumento nos níveis de adenosina agia como bioantimutágeno, diminuindo a taxa de mutação espontânea em culturas de bactérias (LIVIERO, 1996).

A prevenção do câncer e de outras doenças relacionadas ao processo de mutagênese pode ser feita evitando-se a exposição a agentes reconhecidamente mutagênicos ou carcinogênicos, através da ingestão de fatores protetores e do fortalecimento dos mecanismos de defesa (DE FLORA, 1998). Várias revisões têm sido feitas a fim de classificar as substâncias capazes de diminuir as taxas de mutações (AMES, 1983; HARTMAN;

SHANKEL, 1990; FERGUSON, 1994). Kada, Inoue e Namiki (1982) classificaram os agentes ditos antimutagênicos em dois grupos, desmutagênicos e bio-antimutagênicos, de acordo com seu mecanismo de atuação e esta classificação tem sido bastante utilizada principalmente nos ensaios de antimutagenicidade *in vitro*. No mecanismo de desmutagênese, determinados fatores atuam diretamente no agente mutagênico ou em seus precursores, inativando-os antes desses atuarem sobre o DNA. No mecanismo de bio-antimutagênese os fatores atuam sobre processos de mutagênese ou de reparo de DNA danificado, levando à redução da frequência de mutações.

No entanto, as revisões sobre os mecanismos de antimutagênese mais atuais são as de De Flora (1998); De Flora et al. (2001); De Flora; Ferguson (2005), que propõem três níveis para prevenção de mutações e do processo de carcinogênese. Se a intervenção acontecer no indivíduo ainda saudável, ou seja, prevenção do surgimento da doença, é dita primária. O segundo nível de prevenção ocorre em pacientes em estados menos avançados da doença, com detecção precoce e sem manifestações clínicas. E por último, o tratamento após o estabelecimento da doença e a submissão do paciente às terapias a fim de minimizar os efeitos da doença se enquadra no nível terciário de prevenção.

Tornar o organismo mais resistente ao ataque de mutágenos e carcinógenos e, conseqüentemente, inibir a progressão de doenças relacionadas aos processos mutacionais é o que se chama de quimioprevenção e, nela, enquadram-se os mecanismos de prevenção primária e secundária (DE FLORA; FERGUSON, 2005). A prevenção primária engloba os mecanismos de inibição (i) da mutação e da iniciação do câncer no ambiente extracelular ou em células não-alvo; (ii) da mutação e da iniciação do câncer nas células-alvo; (iii) da promoção tumoral. A prevenção secundária está relacionada somente com a inibição da promoção tumoral, que pode ocorrer por atividade antioxidante e seqüestro de radicais livres, inibição de proteases, modulação da transdução de sinais, entre outros (DE FLORA, 2001).

Alguns dos mecanismos de inibição da mutagênese e carcinogênese listados por De Flora (2001) merecem destaque. Ao nível metabólico existem dois mecanismos gerais que atuam na prevenção de mutações e câncer, ambos envolvidos na biotransformação de xenobióticos. Em geral, pró-carcinógenos são convertidos em seus intermediários reativos por enzimas de fase I, que têm como representante principal a família do citocromo P450 (CYP 450). Durante a fase II, a toxicidade da molécula, antes na forma reativa, é reduzida através da ação de outras enzimas, codificadas por genes específicos, que transformam os xenobióticos em substâncias hidrossolúveis, facilmente excretadas. A família das glutationas S-transferases (GST) e N-acetil-transferases (NAT), são as principais responsáveis por essa fase do processo

de metabolização (TANINGHER et al., 1999).

A expressão e regulação coordenada das enzimas envolvidas nesse processo de biotransformação, tanto as de fase I quanto as de fase II, e o seu equilíbrio metabólico nas células de órgãos alvos são importantes fatores na determinação da suscetibilidade ao câncer relacionado à exposição aos carcinógenos (KAWAJIRI et al., 1993).

1.3 QUIMIOPREVENÇÃO E O USO DE FITOQUÍMICOS

Com a descoberta de bactérias e outros organismos patogênicos, ambas, medicina preventiva e curativa, foram eficientes na redução do número de morte por doenças transmissíveis em países desenvolvidos. No entanto, as doenças degenerativas crônicas e o câncer estão entre as chamadas “doenças de origem multifatorial” e são, portanto, de prevenção e tratamento mais difíceis (DE FLORA; FERGUSON, 2005).

Nas últimas duas décadas, um aumento nas evidências obtidas a partir de estudos epidemiológicos e de laboratório, tem demonstrado que algumas plantas como um todo, ou através de compostos isolados, têm efeitos protetores substanciais na carcinogênese humana (SURH; FERGUSON, 2003).

Knasmüller et al. (2002), baseados em sites de procura na internet (Pubmed), estimaram que cerca de 25.000 artigos relacionados à antimutagênese e anticarcinogênese foram publicados nos últimos vinte anos. Desses artigos, mais de 80% avaliaram constituintes de plantas, tanto os consumidos através da alimentação normal (vegetais e frutas, por exemplo) como utilizados com propósitos medicinais.

Compostos isolados de plantas com poder de quimioprevenção são denominados fitoquímicos. Fitoquímicos são substâncias químicas definidas como compostos bioativos, não nutrientes, encontrados em frutas, vegetais, grãos e outras plantas comestíveis, que estão ligados a uma redução no risco da maioria das doenças crônicas (LIU, 2003). Estas moléculas são, principalmente, metabólitos secundários e estão, geralmente, envolvidas na defesa contra a radiação ultravioleta ou agressão por patógenos (MANACH et al., 2004).

De acordo com Liu (2003), os fitoquímicos podem ser classificados como carotenóides, compostos fenólicos, alcalóides, compostos contendo nitrogênio e compostos organossulfurados (Figura 1), sendo os fenólicos e os carotenóides os atualmente mais estudados. Fenólicos são compostos que possuem um ou mais anéis aromáticos com um ou

mais grupos hidroxila e, geralmente, são classificados como ácidos fenólicos, flavonóides, estilbenos, cumarinas e taninos. Estilbenos são encontrados em baixas quantidades na dieta humana e, um deles, resveratrol, para o qual efeitos anticarcinogênicos têm sido demonstrados, é encontrado em baixas quantidades em vinhos (BERTELLI et al., 1998; BHAT; PEZZUTO, 2002).

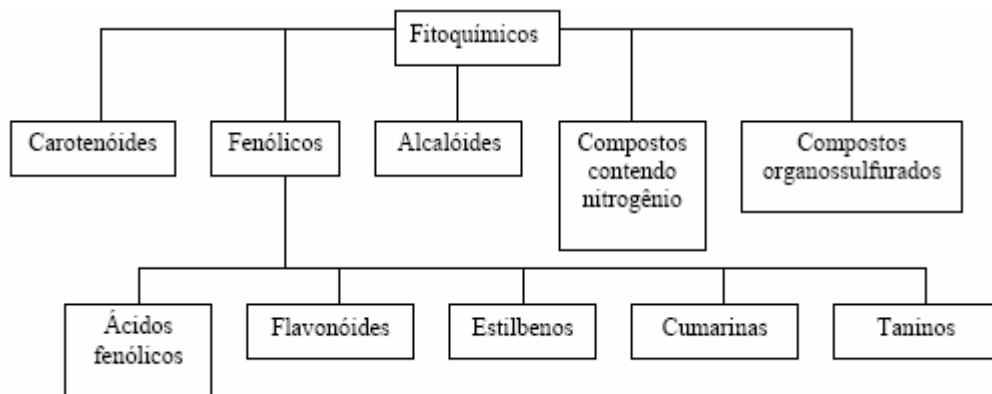


Figura 1 –Classificação dos fitoquímicos de ocorrência natural. Modificado de Liu (2003).

Carotenóides são pigmentos naturais que têm recebido atenção especial devido às suas atividades antioxidantes e à sua ação como provitamina. Esses pigmentos têm funções importantes na fotossíntese e na fotoproteção de tecidos vegetais, sendo esta última função possível graças à capacidade dos carotenóides em seqüestrar e inativar espécies reativas de oxigênio formadas pela exposição à luz e ao ar. Este papel fotoprotetor dos carotenóides está associado com a atividade antioxidante que os mesmos desempenham em seres humanos (MANACH et al., 2004).

Desse modo, o potencial quimiopreventivo de fitoquímicos de ocorrência natural é de grande interesse nos estudos de câncer (PARK; PEZZUTO, 2002), uma vez que inúmeros trabalhos (HUANG et al., 1985; WISEMAN et al., 1997; KAUR et al., 2000; BELICOVÁ et al., 2001, entre outros) já comprovaram ação antimutagênica desses compostos. No entanto, apesar da grande divulgação dos efeitos benéficos dos quimiopreventivos é necessário ressaltar que eles, apesar de naturais, não estão livres de efeitos adversos. Estudos que avaliaram uma possível redução na incidência de câncer de pulmão em indivíduos com alto risco tratados com β -caroteno α - tocoferol mostraram uma incidência 18% maior de câncer nos indivíduos tratados em relação aos não tratados (BOWEN et al., 2003).

A quimioprevenção do câncer surge como um estágio pioneiro na prevenção

da doença, mas ainda não é amplamente aceita ou aplicada. Estudos in vitro, em modelos animais e em seres humanos têm contribuído para identificar um grande número de agentes que podem, potencialmente, ser capazes de diminuir o risco de desenvolvimento de câncer e outras doenças relacionadas ao processo de mutação (DE FLORA; FERGUSON, 2005). No entanto, é necessário que os resultados obtidos em laboratório cheguem efetivamente a ser aplicados em testes clínicos para que a quimioprevenção seja realmente um recurso importante na prevenção de doenças.

1.4 PLANTAS MEDICINAIS E O PROJETO BIOTA

1.4.1 “Programa Biota/Fapesp, O Instituto Virtual da Biodiversidade”

O uso de plantas para fins terapêuticos tem aumentado consideravelmente, assim como a crença de que elas possuem apenas efeitos benéficos e são livres de efeitos colaterais ou adversos. Isso porque a maioria das informações disponíveis sobre o consumo dessas plantas não tem qualquer suporte científico e seu uso é baseado somente na cultura popular (LOPES et al., 2000).

Criado oficialmente em março de 1999, o Programa de Pesquisas em Conservação Sustentável da Biodiversidade, denominado "Programa BIOTA/FAPESP, O Instituto Virtual da Biodiversidade", sensibilizou a comunidade científica que atua na vasta área do conhecimento, quanto ao tema biodiversidade. O programa BIOTA abrange ações concretas para a implementação da Convenção sobre a Diversidade Biológica (CDB), assinada pelo governo brasileiro durante a ECO-92. O objetivo maior do BIOTA-FAPESP é inventariar e caracterizar a biodiversidade do Estado de São Paulo, definindo os mecanismos para sua conservação, seu potencial econômico e sua utilização sustentável. Ações como essa são cada vez mais importantes para o aumento da qualidade de vida da população, e servem como garantia dos direitos das gerações futuras. Sem uma sede fixa, o BIOTA/FAPESP integra todas as informações por meio da Internet. Assim, o rápido acesso às informações sobre a biodiversidade abre novas perspectivas no cenário atual das pesquisas em conservação e uso sustentável da diversidade biológica no Estado de São Paulo (disponível em: <http://www.biota.org>).

O projeto BIOTA engloba vários subprojetos, entre eles o intitulado "Uso sustentável da biodiversidade brasileira: prospecção químico-farmacológica em plantas superiores", que está sendo conduzido pelos grupos de pesquisa em produtos naturais da UNICAMP e da UNESP de Araraquara e Botucatu, com o propósito de avaliar o potencial terapêutico da flora medicinal do Estado de São Paulo. O projeto dá continuidade ao estudo integrado de extratos de plantas do Cerrado do Tocantins e pretende dar uma contribuição centrada no estudo farmacológico, ou seja, isolamento e identificação das substâncias presentes nos extratos vegetais, acompanhada de ensaios farmacológicos para atividades antibacteriana, anti-ulcerogênica, antioxidante e anti-inflamatória/analgésica. As espécies também são submetidas à análise de possíveis propriedades mutagênicas e/ou citotóxicas, objeto de estudo deste trabalho, uma vez que a legislação brasileira prevê que, anteriormente ao seu registro, um potencial fitoterápico deva ser avaliado quanto a essas atividades (CNS, RESOLUÇÃO N°251/97).

1.4.2 Plantas Medicinais e o Gênero *Miconia*

Entre as espécies vegetais avaliadas pelo projeto BIOTA estão as pertencentes à família Melastomataceae. A família Melastomataceae apresenta cerca de 4.570 espécies distribuídas pelas regiões tropicais e subtropicais de todo o globo (CLAUSING; RENNER, 2001). O uso econômico da família concentra-se na existência de espécies ornamentais, como a medinila (*Medinilla magnifica*), a quaresmeira-rasteira (*Schizocentron elegans*), a orelha de onça (*Tibouchina clavata*), espécie nativa das dunas litorâneas e a quaresmeira (*Tibouchina granulosa*) (SOUZA; LORENZI, 2005).

No Brasil ocorrem 63 gêneros, com cerca de 480 espécies; *Miconia*, *Leandra* e *Tibouchina* são os gêneros com maior representação de espécies (BARROSO, 1991). Entre esses gêneros destaca-se o *Miconia*, por ser o maior, com aproximadamente 1000 espécies, distribuídas ao longo da América Tropical e especialmente concentradas nos Andes. No Brasil, estão representadas cerca de 250 espécies, das quais 53 ocorrem no estado de São Paulo (WURDACK; RENNER, 1993).

Trabalhos realizados com espécies pertencentes a este gênero têm revelado resultados promissores quanto a atividades biológicas. Atividade analgésica foi relatada para várias espécies por Vasconcellos et al. (2003), Andrade e Silva et al. (2002), Spessoto et al.

(2003), entre outros. Atividade biocida para formas tripomastigotas do *Tripanosoma cruzi* foi relatada por Cunha et al. (2003) para triterpenos extraídos de *Miconia fallax* DC. e *Miconia stenostachya* DC. Compostos fenólicos de *Miconia myriantha* Benth foram capazes de inibir proteases secretadas por *Candida albicans* (LI et al., 2001). Primim, um antibiótico extraído de plantas do gênero *Miconia*, com estrutura química 2-metoxi-6-n-pentil-p benzoquinona, apresenta uma forte ação antineoplásica em casos de pacientes com carcinoma basocelular e sarcoma de Kaposi (MELO et al., 1974).

As espécies avaliadas neste trabalho possuem também algumas atividades descritas na literatura, porém, nada relacionado com os seus efeitos no DNA (indução, redução ou prevenção de mutações).

Miconia albicans (Sw.) Steud (Figura 2), conhecida popularmente por quaresmeira branca, possui hábito arbustivo, podendo ter de 0,7 a 3 m de altura. Ocorre desde o sul do México e Antilhas até o Paraguai e Paraná. É coletada em cerrado, vegetação secundária ou sobre afloramentos rochosos e formações litorâneas, com flores e frutos durante praticamente todo o ano (GOLDENBERG, 2004). Extratos brutos dessa espécie foram estudados por Vasconcelos et al. (2003) e revelaram efeito analgésico em camundongos.

M. cabucu Hoehne (Figura 3), é conhecida popularmente como “pixiricão” e são árvores possuindo de 5 a 12m de altura (disponível em: <http://www.bdt.fat.org.br/iread>).

Ocorre desde São Paulo até Santa Catarina, podendo ser coletada em Floresta Ombrófila Densa, com flores entre agosto e novembro (GOLDENBERG, 2004). O estudo químico do extrato metanólico (MeOH) das folhas dessa espécie permitiram a identificação de flavonóides MC1 e MC3 e do ácido gálico (MC2) (disponível em: <https://sec.sbq.org.br/cd29ra/resumos/T0296-2.pdf>).

M. rubiginosa (Bonpl.) (Figura 4) ocorre desde a Costa Rica até a Bolívia e no Brasil. Encontrada em cerrados dos estados de Mato Grosso, Bahia, Minas Gerais e São Paulo. É um arbusto de aproximadamente 1m de altura, podendo chegar a uma arvoreta de 5m. O fruto é uma baga violácea com poucas sementes por lóculo. As sementes possuem em média 10 mm de altura por 1,3 mm de largura na base (MARTINS et al., 1996). Foi demonstrado que extratos dessa planta possuem potencial antibacteriano (disponível em: <https://sec.sbq.org.br/cd29ra/resumos/T0598-1.pdf>) e analgésico em camundongos (SPESSOTO et al., 2003).

M. stenostachya DC (Figura 5) possui hábito arbustivo, com altura média de 1,5 m. Ocorre desde o sul do México até a Bolívia, Mato Grosso do Sul e Paraná e pode ser coletada em cerrado, com flores e frutos em outubro (GOLDENBERG, 2004). O

fracionamento de extratos dessa espécie levou ao isolamento de cinco triterpenos, sendo que os ácidos ursólico, oleanóico e gipsogênico foram ativos no combate às formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* no sangue periférico de camundongos (CUNHA et al, 2003).



Figura 2 – *Miconia albicans* (Sw.) Steud (fonte: www.bdt.fat.org.br)



Figura 3 – *Miconia cabucu* Hoehne (fonte: www.bdt.fat.org.br)



Figura 4 – *Miconia rubiginosa* (Bonpl.) (fonte: www.flmnh.ufl.edu/melastomes)



Figura 5 – *Miconia stenostachya* D.C (fonte: www.bdt.fat.org.br)

1.4.3 Gêneros *Indigofera* e *Guapira*

O gênero *Indigofera* (Fabaceae) compreende 700 espécies herbáceas e arbustivas, que ocorrem nas regiões tropicais e subtropicais, encontradas nas Américas, África, Austrália e Ásia (MOREIRA; AZEVEDO-TOZZI, 1997).

Dessas plantas é obtido o índigo (indigotina), um dos corantes naturais mais

antigo que se conhece. Flavonóides, alcalóides, terpenos e saponinas são os metabólitos secundários majoritários em espécies de Fabaceae, os quais possuem interessantes atividades farmacológica e terapêutica (HARBORNE et al., 1971). No entanto, em várias espécies foram encontrados nitrocompostos alifáticos considerados tóxicos (MAJAK; PASS, 1989).

I. truxillensis Kunt é um arbusto ereto e ramificado com até 1,5 m de altura, encontrado no Brasil, Peru e do México até a Bolívia (MOREIRA; AZEVEDO-TOZZI, 1997). Atividades anti-ulcerogênica e antioxidante já foram demonstradas experimentalmente para extratos dessa espécie (COLA-MIRANDA et al., 2006).

Guapira noxia (Netto) Lundell (Figura 6) pertence à família Nyctaginaceae a qual engloba 30 gêneros e 390 espécies de arbustos e herbáceas encontradas nas regiões tropicais e subtropicais (DI STASI; HIRUMA-LIMA, 2002). No Brasil ocorre em campo sujo, campo cerrado, campo rupestre, cerrado, cerradão e bordas de mata galeria e é recomendada em São Paulo para recomposição vegetal, e de interesse para a economia estadual (Disponível em: [www. arboretto.blogspot.com](http://www.arboretto.blogspot.com)). Investigações fitoquímicas com espécies pertencentes à família Nyctaginaceae são escassas e dados sobre possíveis atividades biológicas do gênero *Guapira* ainda não estão disponíveis.



Figura 6 – *Guapira noxia* (Netto) Landell (fonte: [www. arboretto.blogspot.com](http://www.arboretto.blogspot.com))

1.5 TESTE DO MICRONÚCLEO

1.5.1 Teste do Micronúcleo em Células da Medula Óssea e Sangue Periférico de Camundongos

Os testes *in vivo* são importantes na avaliação dos riscos de genotoxicidade e mutagenicidade, porque permitem a consideração de aspectos envolvidos na metabolização da substância em estudo, a administração da mesma por diferentes vias em tratamentos agudos e subcrônicos, além de propiciar a observação dos efeitos da substância-teste em células somáticas e germinativas, no processo de gestação e na prole. Por esses motivos, os ensaios *in vivo* são muito utilizados na investigação de substâncias que tiveram efeitos mutagênicos detectados nos testes *in vitro* (KRISHNA; HAYASHI, 2000).

O teste do micronúcleo, capaz de detectar quebras ou perdas cromossômicas, encontra-se em grande destaque há muito tempo, dada a sua utilização em pesquisas de mutagênese. Trata-se de um método que apresenta, entre outras vantagens, o fato de ser relativamente rápido e barato (SLESINSKI; GUZZIE, 1988).

O micronúcleo se constitui em uma pequena massa nuclear delimitada por membrana e separada do núcleo principal. Durante a divisão celular, o material genético contido no núcleo celular se replica e se divide equitativamente, originando duas células filhas idênticas. Este processo pode sofrer erros, ou pode sofrer interferência de agentes capazes de agir no DNA ou no fuso mitótico gerando, respectivamente, quebras ou perdas de cromossomos inteiros. Quando isto acontece, o material genético fragmentado ou perdido não se incorpora corretamente ao núcleo da célula filha, originando um novo núcleo de tamanho menor que o principal, o micronúcleo (FENECH et al., 1999).

Na década de 70, Werner Schmid padronizou uma técnica para detecção de micronúcleos em eritrócitos policromáticos da medula óssea de camundongos (Figura 7A), que tem servido como padrão para testes *in vivo* que objetivam detectar efeitos clastogênicos e aneugênicos de agentes químicos e físicos (SCHMID, 1975).

Na década de 90, Hayashi et al. (1990) modificaram a técnica original e criaram um método mais prático e rápido para detecção de micronúcleos usando eritrócitos do sangue periférico de roedores (Figura 7B). Embora as células alvo da medula óssea e do sangue periférico sejam as mesmas, os eritroblastos, o método desenvolvido para o sangue

periférico oferece importantes vantagens (CSGMT, 1995). A população de células no sangue periférico é mais uniforme e mais fácil de ser analisada se comparada às células da medula óssea e os resultados podem ser vistos de forma automática. Aliado a este aspecto, está a vantagem de que pequenas amostras de sangue podem ser retiradas repetidamente da cauda dos animais, sem a necessidade dos mesmos serem mortos (HAYASHI, 1990).

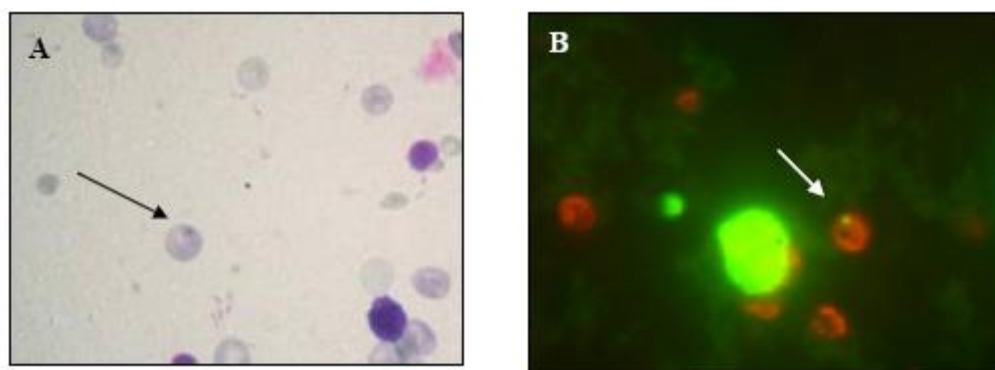


Figura 7 – (A e B): Fotomicrografia de células micronucleadas de camundongos. A: células da medula óssea coradas com Giemsa (MNPCEs). B: células do sangue periférico coradas com laranja de acridina (MNRET). As setas indicam os micronúcleos. Aumento original: 100X.

Apesar de estudos realizados por Holden, Majeska e Studwell (1997) provarem o contrário, ainda acredita-se que o baço dos camundongos apresenta uma reduzida capacidade de seqüestro de células micronucleadas da corrente sanguínea, o que não acontece, por exemplo, com os ratos, onde esse seqüestro ocorre de forma significativa. Isso restringe o uso da técnica de micronúcleo em sangue periférico somente para camundongos e, quando houver a necessidade do uso de outros tipos de roedores no experimento, a técnica mais indicada é a descrita por Schmid em células da medula óssea.

O teste do micronúcleo em células da medula óssea e do sangue periférico de roedores é um dos mais bem estabelecidos testes citogenéticos no campo da genética toxicológica; no entanto, não é uma técnica comumente aplicada às células de outros órgãos *in vivo*. Assim, novos métodos têm sido desenvolvidos para avaliar a frequência de células micronucleadas em uma variedade de linhagens celulares *in vitro* (FENECH, 2000).

1.5.2 Teste do Micronúcleo *in vitro* com Bloqueio de Citocinese

Os estudos *in vitro* avaliam a toxicidade com precisão ao nível celular e em determinados órgãos-alvo. Apresentam várias vantagens, tais como: facilidade para padronizar as condições experimentais (temperatura, pH, composição do meio de cultura, densidade populacional) devido ao material ser relativamente uniforme em seus requisitos metabólicos e em seu comportamento; possibilidade de tratamento das células em várias fases do ciclo celular; economia e boa reprodutibilidade; apresentação de organização dos cromossomos e do seu DNA idênticas às células *in vivo* (RABELLO-GAY et al., 1991), além de eficiência estatística, uma vez que o número de células analisadas é maior em relação a testes como o de aberrações cromossômicas.

Nas técnicas citogenéticas clássicas, cromossomos são estudados diretamente através da observação e contagem de aberrações em metáfases (HEDDLE, 1973). O ensaio de aberrações cromossômicas fornece uma análise mais detalhada que o teste do micronúcleo, porém, a complexidade e o dispêndio de tempo na preparação e classificação das aberrações na metáfase estimularam o desenvolvimento de um sistema de avaliação mais simples do dano cromossômico, o teste do micronúcleo (FENECH, 2000).

Com a posterior padronização desta técnica, o teste de MN *in vitro* (Figura 8) está sendo amplamente utilizado como método para a avaliação de possíveis agentes mutagênicos presentes no ambiente já que esta técnica é de realização simples e rápida e relativamente de baixo custo (FENECH, 2000).

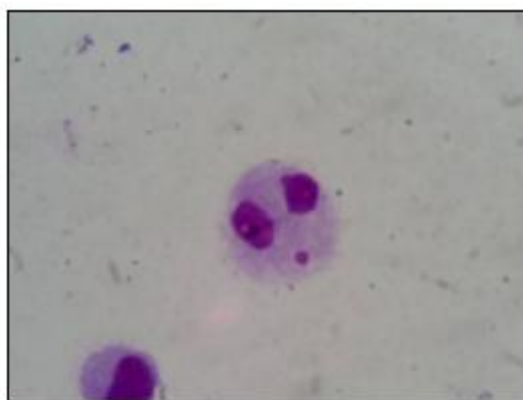


Figura 8 – Fotomicrografia de fibroblasto de hamster Chinês (V 79) binucleada com micronúcleo corada com Giemsa. Aumento original: 100X.

No teste do micronúcleo *in vitro* utiliza-se a citocalasina B (CtB). Esta substância é isolada do fungo *Helminthosporium dermatoidium* e impede a polimerização de filamentos de actina, bloqueando a formação de microfilamentos no final da divisão celular e evitando a citocinese (FALCK; CATALÁN; FORPPA, 1997). Deste modo, a CtB leva ao bloqueio da citocinese, mas não da divisão nuclear, resultando em um acúmulo de células binucleadas a partir de células que sofreram apenas uma divisão celular, independente do grau de sincronia e da proporção de células em divisão (SALVADORI et al., 2003). Cabe ressaltar que em determinadas condições, pode levar até seis horas para que a CtB atinja sua total funcionalidade (FENECH, 2000).

Como todos os outros testes para a avaliação de mutagenicidade e antimutagenicidade, o teste do MN *in vitro* também apresenta vantagens e desvantagens. Dentre as vantagens, a principal é que com o bloqueio da citocinese, todas as células binucleadas visualizadas sofreram apenas uma divisão celular, característica importante para a mensuração da frequência de MNs. As outras vantagens da técnica são: sensibilidade e precisão; detecção de perda cromossômica e detecção de eventos de reparo por excisão (FENECH, 1997). Contudo, esta técnica apresenta algumas desvantagens. Como é necessária a divisão celular para a análise de MN, esta técnica só é efetiva em populações de células em constante divisão; a CtB pode causar interferência na detecção de compostos que podem inibir a citocinese ou a polimerização dos filamentos de actina (SALVADORI et al., 2003).

É evidente, conforme apresentado acima, que os micronúcleos podem ser expressos somente em células eucarióticas em divisão. Em outras palavras, o teste não pode ser usado com eficiência em populações celulares que não estejam em divisão ou em células em que a cinética de divisão nuclear não é bem entendida ou controlada (FENECH, 2000). Um estudo colaborativo entre dez laboratórios foi conduzido a fim de delinear um protocolo para o teste do micronúcleo *in vitro*, utilizando a linhagem celular de fibroblasto de pulmão de hamster Chinês (V79). O teste mostrou ser de fácil execução e os resultados estiveram de acordo, principalmente, com os resultados obtidos através do teste de aberrações cromossômicas *in vitro* (VON DER HUDE et al., 2000).

1.6 ENSAIO COMETA

O princípio básico do Teste do Cometa (ou “Single Cell Gel Electrophoresis”-SCGE) é a migração do DNA em uma matriz de agarose sob condições eletroforéticas. Quando observadas em microscópio, as células têm a aparência de um cometa, com cabeça (a região nuclear) e uma cauda contendo os fragmentos de DNA que migraram em direção ao pólo positivo (HARTMANN et al., 2003).

Os cometas gerados pela técnica podem ser analisados visualmente (KOBAYASHI, 1995) e classificados de acordo com o tamanho da cauda do cometa nas classes 0 (nenhuma migração), 1 (dano pequeno), 2 (dano médio) e 3 (dano máximo) (Figura 9).

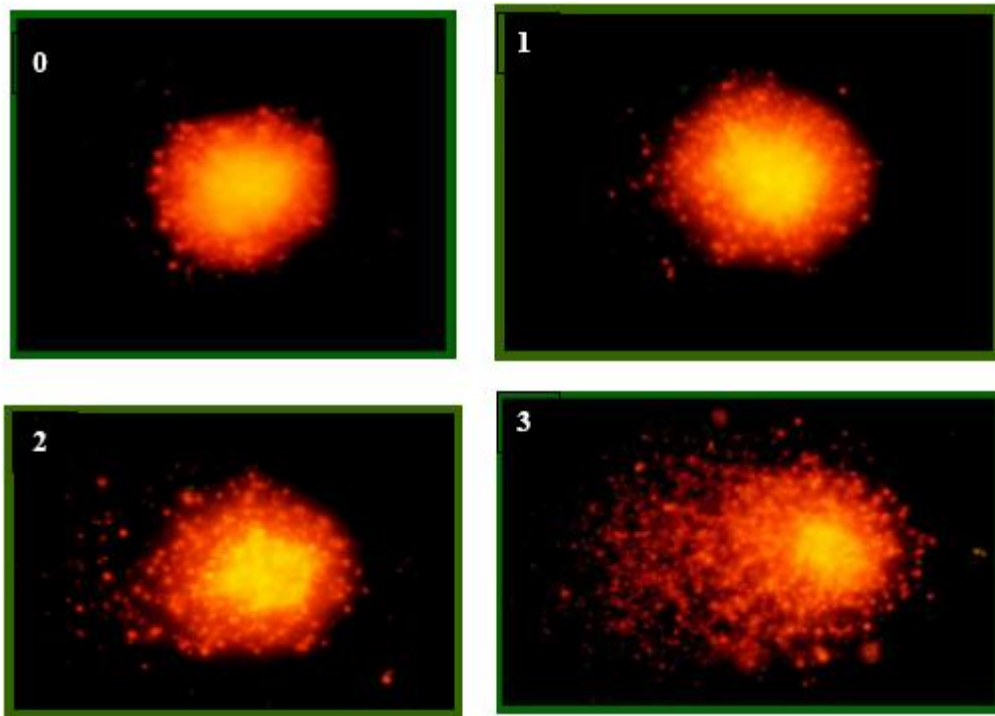


Figura 9 – Fotomicrografias de nucleóides corados com brometo de etídeo. Classificação dos danos no DNA no teste do Cometa. Cedido por Vanzela, T.P. Aumento original: 100X.

O teste tem sido muito utilizado na identificação de agentes com atividades genotóxicas (FARBAIRN et al., 1995). A versão alcalina ($\text{pH} > 13$ do tampão de eletroforese) pode ser usada para detectar danos no DNA do tipo quebras de fita simples, sítios alcali lábeis, pontes entre DNA-DNA e DNA-proteína. Ao contrário das outras alterações, que elevam as taxas de migração do DNA, as pontes podem estabilizar o DNA cromossômico e inibir a migração.

Essas pontes não podem ser visualizadas, mas, sua detecção é feita através de comparação de taxas de migração em relação ao controle negativo. A migração menor que a presente no controle negativo (que apresenta níveis basais de migração) indica a presença dessas pontes, que são lesões relevantes para o processo de mutagênese (PFUHLER; WOLF, 1996; MERK; SPEIT, 1999).

Quebras simples não são consideradas letais e podem ser rapidamente reparadas por mecanismos de reparo disponíveis na célula, enquanto as quebras de fita dupla são mais danosas, podendo levar à liberação de fragmentos que dificilmente são reparados, e freqüentemente resultam em uma mutação (COLLINS et al., 1997).

Lesões no DNA que podem ser detectadas através do ensaio cometa, não são somente quebras de fita, as quais têm um papel relevante na formação de aberrações cromossômicas, mas também modificações nas bases do DNA, como sítios apurínicos e apirimidínicos, que são relevantes na indução de mutações. Nestes casos, os agentes genotóxicos não induzem quebras diretamente, mas atuam gerando tais sítios no DNA. Esses sítios são álcali-labeis e provavelmente são convertidos em quebras em altos pHs, como o utilizado no ensaio cometa alcalino (COLLINS et al., 1997). Contudo, essas lesões primárias são passíveis de reparo e podem não resultar em alterações genéticas (BRENDLER-SCHWAAB et al., 2005).

A versão *in vivo* do teste do cometa tem sido amplamente utilizada em testes de genotoxicidade. As vantagens da realização em animais incluem a aplicabilidade a vários tecidos, ou seja, é possível a verificação de possíveis danos em diferentes órgãos do animal, ele é sensível para detecção de níveis bem baixos de lesões, requer pequeno número de células por amostra, é de fácil execução, requer curto período para conclusão dos experimentos, além de apresentar relativamente baixo custo (TICE et al., 2000).

Embora o teste seja amplamente aplicado, as técnicas de isolamento celular e as condições do experimento nos quais o teste é conduzido variam consideravelmente. A natureza química e o mecanismo de ação do agente mutagênico, a concentração e quantidade de agarose de baixo ponto de fusão (LMP) utilizada, a composição da solução de lise e o tempo de desnaturação alcalina são variáveis técnicas que podem afetar a sensibilidade do teste (OLIVE et al., 1992; SPEIT et al., 1996). No entanto, quando realizado de forma apropriada, o teste tem se mostrado muito seguro e com alta sensibilidade para detecção de danos em órgãos que não podem ser investigados nas análises clássicas como o teste de síntese do DNA não programada (do inglês UDS, *Unscheduled DNA synthesis*) (HARTMANN et al., 2004).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Contribuir no subprojeto de pesquisa “Uso sustentável da biodiversidade brasileira: prospecção químico-farmacológica em plantas superiores”, o qual faz parte do projeto Biota- FAPESP, aumentando os conhecimentos sobre atividades biológicas de plantas utilizadas na medicina popular.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1 Utilizar quatro espécies distintas de plantas do gênero *Miconia* em experimentos para avaliar os potenciais citotóxicos, genotóxicos, mutagênicos e protetores de cada extrato vegetal, utilizando como parâmetros:

- a) o teste do micronúcleo e o ensaio cometa em células de mamíferos *in vivo*.
- b) o ensaio clonogênico e o teste do micronúcleo em células de mamíferos *in vitro*.

2.2.2 Avaliar a citotoxicidade e mutagenicidade de extratos de espécies do gênero *Guapira* e *Indigofera* através do teste do micronúcleo em células da medula óssea de camundongos.

2.2.3 Comparar os resultados obtidos na avaliação da citotoxicidade, genotoxicidade, mutagenicidade e efeitos protetores das diferentes espécies avaliadas.

REFERÊNCIAS

- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Biologia Molecular da Célula**. 4ª edição. Porto Alegre: Artmed, 2004. 1584 p.
- ALVES, E. G.; MARTINS, C. H. G.; CUNHA, W. R.; VINHOLIS, A. H. C.; CASEMIRO, L. A.; ANDRADE E SILVA, M. L. Determinação da Concentração Inibitória Mínima de extratos brutos de *Miconia rubiginosa*. Sociedade Brasileira de Química (SBQ). Disponível em <<https://sec.sbq.org.br/cd29ra/resumos>>. Acesso em 1º de julho de 2006, 15:30 hrs.
- AMES, B. N. Dietary carcinogens and anticarcinogens. **Science**, v. 224, p. 1256-1262, 1983.
- ANDRADE E SILVA, M. L.; CUNHA, W. R.; PEDRO, C.; APARECIDA GARCIA, P.; MARTINS, C. Evaluation of the analgesic activity of an ethanol extract of *Miconia fallax*. **Bollettino Chimico Farmaceutico**, v. 141 (82), p. 158-160, 2002.
- BARROSO, G. M. **Sistemática de Angiospermas do Brasil**. Viçosa: Imprensa Universitária, v. 2, 1991. p. 325.
- BDT, Base de Dados. Tropical Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia André Tosello. Disponível em <<http://www.bdt.fat.org.br/iread>>. Acesso em 1º de julho de 2006, 14:49 hrs.
- BELICOVÁ, A.; KRIZKOVÁ, L.; NAGY, M.; KRAJCOVIC, J.; EBRINGER, L. Phenolic acids reduce the genotoxicity of acridine orange and ofloxacin in *Salmonella typhimurium* TA 102. **Folia Microbiologica**, v. 47, p. 511-514, 2001.
- BERTELLI, A.; BERTELLI, A. A. E.; GOZZINI, A.; GIOVANNINI, L. Plasma and tissue resveratrol concentrations and pharmacological activity. **Drugs Under Experimental and Clinical Research**, v. 24, p. 133-138, 1998.
- BHAT, K. P.; PEZZUTO, J. M. Cancer chemopreventive activity of resveratrol. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 957, p. 210-229, 2002.
- BOWEN, D. J.; THORNQUIST, M.; ANDERSON, K.; BARNETT, M.; POWELL, C.; GOODMAN, G.; OMENN, G. Stopping the active intervention: CARET. **Controlled Clinical Trials**, v. 24, p. 39-50, 2003.
- BRENDLER-SCHWAAB, S.; HARTMANN, A.; PFUHLER, S.; SPEIT, G. The *in vivo* comet assay: use and status in genotoxicity testing. **Mutagenesis**, v. 20 (4), p. 245-254, 2005.

BURNS, G. W.; BOTTINO, P. J. **Genética**. 6ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. 384 p.

COLA-MIRANDA, M.; BARBASTEFANO, V.; HIRUMA-LIMA, C.A.; CALVO, T.R.; VILEGAS, W.; SOUZA BRITO, A.R.M. Antiulcerogenic activity of *Indigofera truxillensis* Kunth. **Biota Neotropica**, v. 6 (3), 2006. Disponível em : <http://www.biotaneotropica.org.br>.

COLLINS, A. R.; DOBSON, V. L.; DUSINSKA, M.; KENNEDY, G.; STETINA, R. The comet assay: what can it really tell us? **Mutation Research**, v. 375(2), p. 183-93, 1997.

CNS – Conselho Nacional de Saúde, resolução nº251, 7/08/1997. Disponível em: <<http://conselho.saude.gov.br/docs/Resolucoes>>. Acesso em: 24/10/2005, 11h:50m.

CLAUSING, G.; RENNER, S. S. Molecular phylogenetics of Melastomataceae and Memecylaceae: implications for character evolution. **American Journal of Botany**, v. 88, p. 486-498, 2001.

CSGMT (Colaborative Study Group for the Micronucleus Tests). **Mutagenesis**, v. 10, p. 153-159, 1995.

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

DE FLORA, S.; IZZOTTI, A.; RANDEPATH, K.; RANDEPATH, E.; BARTSCH, H.; NAIR, J.; BALANSKY, R.; VAN SCHOOTEN, F.; DEGAN, P.; FRONZA, G.; WALSH, D.; LEWTAS, J. DNA adducts and chronic degenerative diseases. Pathogenetic relevance and implications in preventive medicine. **Mutation Research**, v. 366, p. 197-238, 1996.

DE FLORA, S. Mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. **Mutation Research**, v. 402, p. 151-158, 1998.

DE FLORA, S.; IZZOTTI, A.; D'AGOSTINI, F.; BALANSKY, R. M.; NOONAN, D.; ALBINI, A. Multiple points of intervention in the prevention of cancer and other mutation-related diseases. **Mutation Research**, v. 480-481, p. 9-22, 2001.

DE FLORA, S.; FERGUSON, L. R. Overview of mechanisms of cancer chemopreventive agents. **Mutation Research**, v. 591, p. 8-15, 2005.

DIAZ, L. A. Jr. The current clinical value of genomic instability. **Seminars in Câncer Biology**, v. 15, p. 67-71, 2005.

DI STASI, L. C.; HIRUMA-LIMA, C. A. **Plantas Medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. 2. ed. São Paulo: Unesp, 2002. 604 p.

FALCK, G.; CATALÁN, J.; FORPPA, H. Influence of culture time on the frequency and contents of human lymphocyte micronuclei with and without cytochalasin B. **Mutation Research**, v. 392, p. 71-79, 1997.

FARBAIRN, D. W.; OLIVE, P.L.; O'NEILL, K. L. The Comet assay: a comprehensive review. **Mutation Research**, v. 339, p. 37-59, 1995.

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

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

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

FERGUSON, L. R. Antimutagens as cancer chemopreventive agents in the diet. **Mutation Research**, v. 307, p. 395-410, 1994.

GOLDENBERG, R. O gênero *Miconia* (Melastomataceae) no Estado do Paraná, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 18(4), p. 927-947, 2004.

HARBONE, J. B.; BOULTER, D.; TURNER, B. L. **Chemotaxonomy of the Leguminosae**. London: Academic Press, 1971.

HARTMAN, P. E.; SHANKEL, D. M. Antimutagens and anticarcinogens: a survey of putative interceptor molecules. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 15, p. 145-182, 1990.

HARTMANN, A.; AGURELL, E.; BEEVERS, C.; BRENDLER-SCHWAAB, S.; BURLINSON, B.; CLAY, P.; COLLINS, A.; SMITH, A.; SPEIT, G.; THYBAUD, V.; TICE, R. R. Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline Comet assay. **Mutagenesis**, v. 18 (1), p. 45-51, 2003.

HARTMANN, A.; SCHUMACHER, M.; PLAPPERT-HELBIG, U.; LOWE, P.; SUTER, W.; MUELLER, L. Use of the alkaline *in vivo* comet assay for mechanistic genotoxicity investigations. **Mutagenesis**, v. 19, p. 51-59, 2004.

HATAGIMA, A. Genetic polymorphisms and metabolism of endocrine disruptors in cancer susceptibility. **Saúde Pública**, v. 18, p. 357-377, 2002.

HAYASHI, M.; MORITA, T.; KODAMA, Y.; SOFUNI, T.; ISHIDATE, M. The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange – coated slides. **Mutation Research**, v. 245 (4), p. 245-249, 1990.

HEDDLE, J. A. A rapid *in vivo* test for chromosome damage. **Mutation Research**, v. 18, p. 187-192, 1973.

HOLDEN, H. E.; MAJESKA, J. B.; STUDWELL, D. A direct comparison of mouse and rat bone marrow and blood as target tissues in the micronucleus assay. **Mutation Research**, v. 391, p. 87-89, 1997.

HUANG, M. T.; CHANG, R. L.; WOOD, A. W.; NEWMARK, H. L.; SAYER, J. M.; YAGI, H.; JERINA, D. M.; CONNEY, A. H. Inhibition of the mutagenicity of the bay region diol epoxides of polycyclic hydrocarbons by tannic acid, hydroxylated anthraquinones and hydroxylated cinnamic acid derivatives. **Carcinogenesis**, v. 6, p. 237-242, 1985.

KADA, T.; INOUE, T.; NAMIKI, N. **Environmental Desmutagens and Antimutagens**. In: E.J. Klekowski (ed.) *Environmental Mutagenesis and Plant Biology*, Praeger, New York, pp. 137-151, 1982.

KAUR, S. J.; GROVER, I. S.; KUMAR, S. Modulatory effects of a tannin fraction isolated from *Terminalia arjuna* on the genotoxicity of mutagens in *Salmonella typhimurium*. **Food and Chemical Toxicology**, v. 38, p. 1113-1119, 2000.

KAWAJIRI, K.; NAKACHI, K.; IMAI, K.; WATANABE, J.; HAYASHI, S. The CYP1A1 gene and cancer susceptibility. **Critical Reviews in Hematologic Oncology**, v. 14, p. 77-87, 1993.

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

KNASMÜLLER, S.; STEINLELLNER, H.; MAJER, B. J.; NOBIS, E. C.; SCHARF, G.; KASSIE, F. Search for dietary antimutagens and anticarcinogens: methodological aspects and extrapolation problems. **Food and Chemical Toxicology**, v. 40, p. 1051-1062, 2002.

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

LIU, R. H. Health benefits of fruits and vegetables are from additive and synergistic combination of Phytochemicals. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 78, p. 517-520, 2003.

LI, X.; JACOB, M. R.; PASCO, D. S.; ELSOHLY, H. N.; NIMROD, A. C.; WALKER, L. A.; CLARK, A. M. Phenolic compounds from *Miconia myriantha* inhibiting *Candida* aspartic proteases. **Journal of Natural Products**, v. 64 (10), p. 1282-1285, 2001.

LIVIERO, L.; VON BORSTEL, R. C. The 4th International Conference on Mechanisms of Antimutagenesis and Anticarcinogenesis: A Summary, Mechanisms of Antimutagenesis and Anticarcinogenesis. **Mutation Research**, v. 350 (1), p. 287-293, 1996.

LOPES, L. C.; ALBANO, F.; LARANJA, G. A. T.; ALVES, L. M.; SILVA, L. F. M. E.; SOUZA, G. P.; ARAUJO, I. M.; FELZENSZWALB, I.; KOVARY, K. Toxicological evaluation by *in vitro* and *in vivo* assays of an aqueous extract prepared from *Echinodorus macrophyllus* leaves. **Toxicology Letters**, v. 1161, p. 189-198, 2000.

MAJAK, W.; PASS, M. A. Glycosides. In: **Toxicants of Plant Origin**. Florida: CRC Press, Boca Raton, 1989. v. 2, p. 143.

MALACINSKI, G. M. Mutações, Mutagênese e Reparo do DNA. In: _____ **Fundamentos de Biologia Molecular**. 4ª edição. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 2005. p. 175-198.

MALLING, H. V. Incorporation of mammalian metabolism into mutagenicity testing. **Mutation Research**, v. 566, p. 183-189, 2004.

MANACH, C.; SCALBERT, A.; MORAND, C.; RÉMÉSY, C.; JIMÉNEZ, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 79, p. 727-747, 2004.

MARTINS, A. B.; SEMIR, J.; GOLDENBERG, R.; MARTINS, E. O gênero *Miconia* RUIZ & PAV. (Melastomataceae) no estado de São Paulo. **Acta Botanica Brasilica**, v. 10, p. 267-316, 1996.

MELO, A. M.; JARDIM, M. L.; DE SANTANA, C. F.; LACET, Y.; LOBO FILHO, J.; DE LIMA, E.; IVAN LEÔNIO, O. G. First observations on the topical use of Primin, Plumbagin and Maytenin in patients with skin cancer. **Revista do Instituto de Antibióticos (Recife)**, v. 14 (1-2), p. 9-16, 1974.

MERK, O.; SPEIT, G. Detection of crosslinks with the comet assay in relationship to genotoxicity and cytotoxicity. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 33, p. 167-172, 1999.

MOREIRA, J. L. A.; AZEVEDO-TOZZI, A. N. G. *Indigofera* L. (Leguminosae, Papilionoideae) no Estado de São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 20, n.1, p. 97-117, 1997.

NATARAJAN, A. T. Chromosome aberrations: past, present and future. **Mutation Research**, v. 504, p. 3-16, 2002.

OLIVE, P. L.; WLODEK, D.; DURAND, R. E.; BANÁTH, J. P. Factors influencing DNA migration from individual cells subjected to gel eletrophoresis. **Experimental Cell Research**, v. 198, p. 259-267, 1992.

PARK, E. J.; PEZZUTO, J. M. Botanicals in cancer chemoprevention. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 21(3-4), p. 231-55, 2002.

PFUHLER, S.; WOLF, H. U. Detection of DNA-crosslinking agents with the alkaline comet assay. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 27, p. 196-201, 1996.

RABELLO-GAY, N.; RODRIGUES, M. A. R.; MONTELEONE-NETO, R. (eds). **Mutagênese, Teratogênese e Carcinogênese: Métodos e critérios de avaliação**. Ribeirão Preto. Ed. Sociedade Brasileira de Genética, 1991.

RAMALHO, M. A. P.; SANTOS, J. B.; PINTO, C. A. B. P. Teoria Sintética da Evolução. In: _____ **Genética na Agropecuária**. 3ª edição. Lavras: Ed. UFLA, 2004. p. 337-348.

RODRIGUES, J.; SANTOS, L. C.; TAMASHIRO, J.; BRITO, A. R. M. S.; VILEGAS, W. Constituintes químicos isolados das folhas de *Miconia cabucu* Hoehne (Melastomataceae). Sociedade Brasileira de Química (SBQ). Disponível em <<https://sec.sbq.org.br/cd29ra/resumos>>. Acesso em 1º de julho de 2006, 14:49 hrs.

SALVADOR, D. M. F.; RIBEIRO, L. R.; FENECH, M.. **Teste do micronúcleo em células humanas *in vitro***. In: Mutagênese Ambiental. Org. Ribeiro, L. R.; Salvadori, D. M. F.; marques, E. K. Ed. Ulbra: Canoas, p. 201-224, 2003.

SNUSTAD, D. P.; SIMMONS, M. J. O DNA e a Estrutura Molecular dos Cromossomos. In: _____. **Fundamentos de Genética**. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 2001. p. 191-221.

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

SILVA JR, M. C. **100 Árvores do Cerrado**. Brasília: Rede de Sementes do Cerrado, 2005.

SLESISKI, R. S; GUZZIE, P. J. Review of Recent Advances in the Development and Application of the Micronucleus Test System. In: BALLANTYNE, **B. Perspectives in Basic and Applied Toxicology**. Wright, 1988. p. 161-176.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática**. 1ª edição. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2005. p. 269-270.

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**, v. 88, p. 91-98, 1996.

SPESSOTO, M. A.; FERREIRA, D. S.; CROTTI, A. E. M.; SILVA, M. L. A.; CUNHA, W. R. Evaluation of the analgesic activity of extracts of *Miconia rubiginosa* (Melastomataceae). **Phytomedicine**, v. 10 (6-7), p. 606-609, 2003.

SURH, Y.; FERGUSON, L. R. Dietary and medicinal antimutagens and anticarcinogens: molecular mechanisms and chemopreventive potential – highlights of a symposium. **Mutation Research**, v. 524, p. 1-8, 2003.

TANINGHER, M.; MALACARNE, D.; IZZOTTI, A.; UGOLINI, D.; PARODI, S. Drug metabolism polymorphisms as modulators of cancer susceptibility. **Mutation Research**, v. 436, p. 227-261, 1999.

TICE, R. R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J. C.; SASAKI, Y. F. The single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 35, p. 206-221, 2000.

VASCONCELOS, M. A. L.; FERREIRA, D. S.; ANDRADE E SILVA, M. L.; SOLA VENEZIANI, R. C.; CUNHA, W. R.. Analgesic effects of crude extracts of *Miconia albicans* (Melastomataceae). **Bolletino Chimico Farmacêutico**, v. 142 (8), p. 333-335, 2003.

VON DER HUDE, W.; KALWEIT, S.; ENGELHARDT, G.; MCKIERNAN, S.; KASPER, P.; SLACIK-ERBEN, R.; MILTENBURGER, H. G.; HONARVAR, N.; FAHRIG, R.; GÖRLITZ, B.; ALBERTINI, S.; KIRCHNER, S.; UTESCH, D.; PÖTTER-LOCHER, F.; STOPPER, H.; MADLE, S. *In vitro* micronucleus assay with Chinese hamster V79 cells - results of a collaborative study with in situ exposure to 26 chemical substances. **Mutation Research**, v. 468(2), p. 137-63, 2000.

WISEMAN, S. A.; BALENTINE, D. A.; FREI, B. Antioxidants of tea. **Food Science Nutrition**, v. 37, p. 705-718, 1997.

WÜNSCH, V. F.; ZAGO, M. A. Modern cancer epidemiological research: genetic polymorphisms and environment. **Saúde Pública**, v. 39(3), p. 490-497, 2005.

WURDACK, J. J.; RENNER, S. S. **Melastomataceae**. In: Van Rijn. Flora of the Guianas. Koenigstein : Koeltz Scientific Books, 1993.

ZAHA, A. (Coord.) **Biologia Molecular Básica**. Porto Alegre: Ed. Mercado Aberto, 1996.

3 EXPERIMENTOS *IN VIVO*

3.1 ARTIGO 1

***In vivo* assessment of DNA damage and protective effects of extracts from *Miconia* species using the comet assay and micronucleus test**



Artigo a ser submetido à Revista Mutagenesis

ISSN: 0267-8357

Impact factor: 2.125

***In vivo* assessment of DNA damage and protective effects of extracts from *Miconia* species using the comet assay and micronucleus test**

Juliana Mara Serpeloni^a, Mariana Bizarro dos Reis^a, Juliana Rodrigues^b, Lourdes Campaner dos Santos^b, Wagner Vilegas^b, Eliana A. Varanda^c, Anne L. Dokkedal^d, Ilce Mara S. Cólus^{a*}

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

^b *Araraquara Institute of Chemistry, São Paulo State University, Araraquara, SP, Brazil*

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

^d *Department of Biological Sciences, Bauru Faculty of Sciences, Paulista State University, SP, Brazil*

* Corresponding author:

Tel: +55 43-33714191; Fax: +55 43-33714527

E-mail address: colus@sercomtel.com.br

Abstract

The genus *Miconia* comprises approximately 1000 species belonging to the Melastomataceae family. Several crude plants extracts from *Miconia* and their isolated compounds showed biological activities like analgesic and antineoplastic action, however, no study concerning their effects on DNA is available. The aim of the present study was to evaluate, *in vivo*, the genotoxic and mutagenic effects of four species of plants from *Miconia* genus using the comet assay and micronucleus test. Their possible protective effects were also evaluated in experiments associating the plant extracts with cyclophosphamide. The methanolic extracts of *M. albicans*, *M. cabucu*, *M. rubiginosa*, *M. stenostachya* and the chloroformic extract from *M. albicans* were investigated. For genotoxic and mutagenic evaluation, three concentrations were tested, 200, 400 and 540 mg/kg b.w., based on the solubility limit of the extract in distilled water. As for the protective effects, only the higher dose was evaluated against 40 mg/kg b.w. of cyclophosphamide (CP). The blood was removed from the animal's tail before (T0) and after the treatment (T1-30h) for the micronucleus test (MN) and 24 hours after the treatment for the comet assay. The *t-Student* test was used to compare between data obtained at T0 and T1 and ANOVA-Tukey to compare between groups in the micronucleus test and the Kruskal-Wallis and Dunn's test was used to compare between the different groups in comet assay. All the extracts induced alterations in DNA migration (comet assay). Nevertheless, no mutagenic effect was seen in the MN assay. All extracts showed a protective effect against cyclophosphamide in both assays. Chemical analysis of the extracts suggests that the presence of phenolic acids, tannins, flavonoids and catechins could be responsible for the protective effect. Although mutagenic effects were not seen, further investigations should be made to guarantee these results. Also the protective effect detected has encouraged new studies regarding these extracts.

Introduction

The use of plants for healing purposes is becoming increasingly popular, as they are believed to be beneficial and free of side effects. However, most of information available on several medicinal herbs does not have any scientific supporting data and their use as medicaments is based simply on traditional folk usage that has been perpetuated down through several generations (1).

Miconia is a genus including approximately 1000 species occurring in tropical America (2, 3). The genus belongs to the Melastomataceae family, which is pantropical with over 166 genera which include about 4300 species (2). Many of these plants are used as medicine by people living in the Cerrado area, a Brazilian savannah ecosystem.

Studies aiming to describe several biological activities of the *Miconia* species have shown promising results. Some studies have described the analgesic effects of the crude extracts (hexane, methylene chloride and ethanol) obtained from *Miconia* species (4-6). The triterpenes ursolic acid, oleanolic acid and gypsogenic acid of *Miconia fallax* DC. and *Miconia stenostachya* (Schrank & Mart.) DC. were active against blood trypomastigote forms of *Trypanosoma cruzi* (7). Phenolic compounds from *Miconia myriantha* Benth showed inhibitory effects against aspartic proteases secreted by *Candida albicans* (8). Primin, an antibiotic extracted from *Miconia* sp. (Herb. I.A.-1903) with a 2-methoxy-6-n-pentyl-p benzoquinone structure, presented strong antineoplastic action in cases of patients having basal cell carcinoma, and one case of a patient having Kaposi's sarcoma (9).

Although several biological activities of *Miconia* species have been reported, no study concerning its effects on DNA (induction, reduction or prevention of mutations) has become available for the species from this work until the present time. Mutations in somatic cells are important in the evolutionary process but are also involved in the mechanism of carcinogenesis, and have a relevant role in degenerative chronic diseases such as arteriosclerosis and heart diseases, which are the main cause of death in the human population (10).

As most cancers are likely to be associated with mutagens and/or mitogens, researches focusing on compounds that may inhibit or reverse either of the related processes may be crucial in the search for chemotherapeutic agents (11). Epidemiologic studies have suggested that a reduced risk of cancer is associated with a high consumption of vegetables and fruit. Thus, the cancer chemopreventive potential of naturally occurring phytochemicals is of great interest (12). Antimutagenic activity was described for compounds isolated from plants, such as phenolic acids (ferulic and gentisic acids) (13), tannins and flavonoids (14; 15; 16) and also terpenes (17).

The aim of the present study was to assess *in vivo*, using the comet assay and the micronucleus test, the genotoxic and mutagenic potential of extracts from four *Miconia* species and also the possible protective effects of these extracts against the damage induced on DNA by cyclophosphamide.

Material and methods

Chemicals

Cyclophosphamide (CPA) (Sigma – CAS: 50-18-0) was diluted in distilled water and used as positive control and as the damage-inducing agent in tests.

Animals

Male and female albino Swiss mice (*Mus musculus*) being five to six weeks old, weighing approximately 30g, were used for the comet assay and micronucleus test. They were from State University of Londrina (Parana – Brazil) and were kept individually in polypropylene cages following the conditions for animal care recommended by the Canadian Council on Animal Care (18).

Two hundred and fifty animals were divided into groups of ten (five males and five females) for each treatment and the animals were the same for both endpoints utilized (comet assay and micronucleus test).

Plant material, extract preparation and isolation

The aerial parts of *Miconia cabucu* Hoehne were collected in April of 2005 at Pariquera-Açu, São Paulo State, Brazil, and authenticated by Dr. Jorge Yoshio Tamashiro from the Instituto de Biologia, UNICAMP, São Paulo. A voucher specimen (no. 1430) has been deposited in the Herbarium of the Universidade Estadual de Campinas, Brazil.

Miconia rubiginosa (Bonpl.) (voucher BOTU 25.376) and *Miconia stenostachya* D.C (voucher BOTU 25.377) were collected in March of 2005 at Palmeiras da Serra, Pratânia, São Paulo State, Brazil and authenticated by Luiz Fernando Rolim de Almeida from the Instituto de Botânica, UNESP. Voucher specimens were deposited at the Herbarium “Irina Delanova Gemtchujnicov” BOTU of the Instituto de Biociências, UNESP, Botucatu.

Miconia albicans (Sw.) Steud leaves were collected in the Universidade Estadual Paulista (UNESP) campus of Bauru (São Paulo, Brazil) and identified by Dra. Anne L. Dokkedal. A voucher specimen was deposited in the Herbarium of the Biology Department of UNESP/Bauru (UNBA), under number ALD 145.

The aerial parts obtained from each specie were dried (at 40 °C for 4 days) and powdered. The dry powdered material was macerated with 2 L of chloroform and methanol successively at room temperature (3 times and left for 48 hours in each solvent). Solvents were filtered and evaporated at 35°C under reduced pressure affording CHCl₃ and MeOH

extracts respectively. The quantity of extract obtained from all species studied in this work were in percentage: 15.0 and 3.1 for MeOH and CHCl₃ of *M. albicans* and 3.3, 9.3, 14.6 respectively for *M. cabucu*, *M. rubiginosa* and *M. stenostachya*.

Chromatographic analysis of the species studied.

The chemical constituents present in the extracts of the species studied were identified according to the method of Wagner et al, 1984 (19). The chromatographic analyses were carried out on glass plates (5-30 cm) coated with Fluka F254 silica gel 0.25 mm thick and eluted in three different solvent systems: *n*-butanol/acetic acid/water (BAW) 65:15:35 v/v; and chloroform/methanol/ammonia 8:2:0.5 v/v; and chloroform/methanol/*n*-propanol/water 5:6:1:4 v/v (lower layer). After, 5 mg of each extract were dissolved in 1 mL of a 1:1 v/v mixture of methanol–water, submitted to an ultrasonic bath for 5 min and then centrifuged. Approximately 10 mL of the solution was spotted onto the TLC plates. Alkaloids were detected by spraying the plates with Dragendorff's reagent or iodoplatinate. Anthraquinones were detected using 10% potassium hydroxide solution in methanol. Flavonoids were detected by their intense fluorescence in visible or UV light when developed with a natural product/polyethylene glycol (NP/PEG) reagent. General phenolic compounds were detected after exposing the plates to ammonia vapors and immediately observing the fluorescent spots under UV light. Saponins, triterpenes, and steroids were detected either with anisaldehyde–sulphuric acid reagent or sulphate–sulphuric acid solution, which produced a range of colors after heating for 5 min at 100 °C. Tannins were detected with 5% ferric chloride solution in methanol and with 1% gelatin solution.

Experimental design

The animals were treated with 0.1mL of each of the solutions for every 10g of body weight and they received water and food *ad libitum* throughout the treatment period. To evaluate the genotoxicity and mutagenicity of the extracts, the extracts were assessed in three different doses: 200, 400 and 540 mg/kg b.w., via gavage. These doses were based on the solubility limit of the extract in distilled water. In view of the low solubility of the CHCl₃ extract, it was diluted in Tween 8%.

A negative, a positive and a solvent control group were established for the treatment of the animals with distilled water, cyclophosphamide (40 mg/kg b.w. i.p.) and Tween 8%, respectively. To assess the antimutagenic activity of four *Miconia* species, cyclophosphamide was administrated in a single dose intraperitoneally and one hour after this, the plant extract

was administered via gavage. Only the highest dose, 540 mg/kg b.w., of each extract was evaluated with respect to its protective effects.

Comet assay

The alkaline version of the comet assay was performed according to guidelines proposed by Singh et al. (20), with a slight modification (21). Twenty-four hours after the treatment, 20 μ L of heparinized periphery blood were mixed with 120 μ L of 0.5% low-melting-temperature agarose in PBS and applied to microscope slides pre-coated with 1.5% normal-melting-temperature agarose in PBS. The slides were covered with a microscope coverslip and refrigerated for 5 min to gel. This was followed by immersion in ice-cold alkaline lysing solution (2.5M NaCl, 10 mM Tris, 100 mM EDTA, 10% DMSO, 1% Triton X-100, final pH 10.0) for at least 1 h. The slides were then incubated for 20 min in ice-cold electrophoresis solution (0.3 M NaOH, 1 mM EDTA, pH>13), followed by electrophoresis at 25 V:300 mA (1.25 V/cm) for 25 min (22). After electrophoresis, the slides were then neutralized (Tris 0.4 M, pH 7.5) and stained with ethidium bromide (20 μ g/mL). One hundred cells per animal (two slides of 50 cells each) were analyzed at 400 X using a fluorescence microscope (Nikon) with a blue (488 nm) excitation filter and yellow (515 nm) emission (barrier) filter. One scorer was used throughout the study and all slides were coded. Quantification of DNA breakage was achieved by visual scoring and the cells were classified into four categories representing each different degree of DNA damage, ranging from no visible migration (type 0, undamaged cells) to the maximum length comet (type 3, maximally damaged cells) (23).

The frequency of damaged cells (DC) was obtained by adding up the number of cells with damage from classes 1, 2 and 3 and then dividing by the total number of cells analyzed in each treatment. The total score for 100 comets was obtained by multiplying the number of cells in each class by the damage class, according to the formula modified from Manoharan and Banerjee (24). Total score = $(0 \times n_0) + (1 \times n_1) + (2 \times n_2) + (3 \times n_3)$, where n = number of cells in each class analyzed. Thus, the total score could range from 0 to 300.

The percentage reduction in the comet assay for the treatments with extracts showing antigenotoxicity was calculated according to Manoharan and Banerjee (24) and Waters et al. (25) using the formula:

$$\text{Reduction (\%)} = \frac{\text{mean score in A} - \text{mean score in B}}{\text{mean score in A} - \text{mean score in C}} \times 100$$

where A is the group of cells treated with CPA (positive control); B the group of cells treated with the extracts plus CPA and C the negative control.

The data were not homogeneous in regard to variance, so the Kruskal-Wallis test with Dunn's post-hoc test was used to analyze the results.

Micronucleus test

The micronucleus test was performed on peripheral blood cells from the tail vein according to the protocol described by Hayashi et al. (26), which uses slides pre-stained with acridine orange (CAS: 494-38-2). The glass slides were heated to about 70°C on a hot-plate and a 10µL drop of an aqueous solution of the dye (1 mg/mL) was placed on each slide and spread evenly over the surface with the end of a second well-cleaned slide. Once dry, the slides were kept in the dark at room temperature for at least 24 h.

An internal control was established for each animal by preparing a test slide with a drop of blood taken from its tail before the first treatment (time T_0). Thirty hours after the treatment with the different compounds (T_1), blood was obtained by perforating the caudal vein of the mouse with a needle and collecting 5 µL drops, each of which was placed at the centre of a pre-stained slide and covered with a cover-slip (24 x 50 mm). These slides were then kept in the dark at -20°C for a minimum of 24 h before the cytological examination of the blood cells was done.

The cell preparations were examined under a fluorescence microscope (Nikon) with a blue (488 nm) excitation filter and yellow (515 nm) emission (barrier) filter, using an immersion objective. One thousand reticulocytes per treated animal were analyzed and the proportion of micronucleated cells counted.

The mean frequencies of micronucleated cells obtained for times T_0 and T_1 in each treatment group were compared applying the *Student t-test* ($p < 0.05$). The statistical ANOVA-Tukey test was performed to calculate the means and standard deviations in order to compare the results obtained for the groups treated with extracts and for control groups. The percentage reduction in the frequencies of micronucleated cells from the treatments with extracts that showed antimutagenicity was calculated according to Manoharan and Banerjee (24) Waters et al. (25) as described above.

Results

The compounds present in each species were flavonoids, tannins and phenolic compounds. Fractionation of the methanolic extract from *M. cabucu* was done by Rodrigues et al. (2007) (27) and led to the isolation of the biflavonoid 5-hydroxy-4',7-dimethoxyflavone-(6-C-6'')-5''-hydroxy-3''',4''',7''-trimethoxyflavone, gallic acid and flavonoids quercetin-3-*O*- β -xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-*O*- α -rhamnopyranoside, quercetin-3-*O*- α -rhamnopyranoside, myricetin-3-*O*- α -rhamnopyranoside, quercetin-3-*O*- β -glucopyranoside, kaempferol-3-*O*- β -(6''-coumaroyl)-glucopyranoside, myricetin-3-*O*- β -xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-*O*- α -rhamnopyranoside reported in literature. The study of *M. rubiginosa* led to the identification of gallic acid, quercetin-3-*O*- α -rhamnopyranoside, quercetin-3-*O*- β -arabinofuranoside, quercetin-3-*O*- α -arabinopyranoside, quercetin-3-*O*- β -arabinopyranoside, quercetin-3-*O*- β -galactopyranoside, quercetin-3-*O*- α -rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-*O*- β -galactopyranoside and epicatechin. The study so far of the methanolic extract of *M. stenostachya* led to the isolation of glycosilated flavonoids derived of quercetin and myricetin and catechin derivatives (unpublished data). Data from *M. albicans* were not available yet.

The results of genotoxicity, mutagenicity and protective effects obtained for males and females were joined to constitute Tables I, II, III, and IV, since there was no statistical difference between the results observed for these groups, demonstrating that gender differences do not modify the activity of the plant extract in the animals.

Table I shows the results of the genotoxicity assessment for three doses (200, 400 and 540 mg/kg b.w.) from five plant extracts. The average values of the scores and frequency of damaged cells obtained for all doses and extracts evaluated were statistically different from the negative control, indicating genotoxic activity.

Negative results for mutagenic effect were observed for all treatment groups (Table II). Statistical differences between T_0 and T_1 (t-Student test) were detected only for the positive control group (cyclophosphamide). After 30 hours of treatment (T_1), the data of all experimental groups were compared between themselves using ANOVA and Tukey tests. Only the positive control group differed from the others.

→ Table I and → Table II

All extracts presented protective activity because the results were statistically different from that obtained from the cyclophosphamide treatment alone, indicating a reduction in the

scores and frequency of damaged cells (Table III) and also the frequency of micronucleated cells (Table IV) caused by cyclophosphamide.

→ Table III and → Table IV

The percentage reductions of damage in the comet and micronucleus assays after treatments with different extracts of *Miconia* species were calculated and are presented in Figure 1. The frequency of damaged cells was reduced to around 41.33% for the treatments with the MeOH extract of *M. albicans* and *M. stenostachya*. The respective minimum and maximum reductions of scores observed for all species were 44.22% for *M. rubiginosa* and 49.90% for *M. albicans*. The reduction of micronucleated cells was more significant (69.78%) in the group treated with the CHCl₃ extract of *M. albicans* and less expressive (52.20%) for the MeOH extract of the same specie.

→ Figure 1

Discussion

In order to develop unknown products and chemicals, it is necessary to determine their potential mutagenic effects. A balance between the therapeutic-versus-toxicological effects of the compound is important when verifying its applicability as a pharmacological drug (28).

All of the *Miconia* extracts evaluated presented a low level of genotoxicity according the comet classes detect (predominance of comet class 1). The values obtained for cells treated with extracts were mid-range between those obtained in the negative control group and the group treated with the known mutagen CPA. This fact suggests a moderate genotoxicity of the extracts. In the comet assay, it was possible to quantify and to distinguish cells with different rates of DNA damage, thus the analysis of the average values of the scores for each group becomes very important. In the present work, a predominance of comet classes 1 was observed for all treatment groups and almost no predominance for comet classes 2 and 3, differing from the data obtained for CPA, where comet classes 1 and 2 predominated.

The consequences of disturbances in the DNA molecule, such as adducts, along with single and double-strand breaks, might cause lesions that become permanent. The use of micronucleus assay is an excellent means of evaluating any permanent damage in the genetic material. The same extracts of this manuscript were evaluated in our laboratory about their

potential cytotoxicity (clonogenic assay) and mutagenicity (micronucleus test) in V 79 cell line *in vitro* and three non cytotoxic concentrations, chosen through clonogenic assay (5, 10 e 20 µg/mL), showed absence of mutagenicity (unpublished data). The negative results for the mutagenicity observed *in vivo* in the present study may indicate that (i) the primary lesions (strand breaks) in the comet assay were repaired and these did not permit the observation of micronuclei, (ii) the lesions brought about in comet assay were mainly single strand breaks that are less effective than double strand breaks in the production of chromosome fragments (29), (iii) prevalent DNA lesions leading to effects in the comet assay may have been DNA modifications such as abasic sites (AP sites) involved predominantly in the induction of gene mutations (30) rather than in induction micronucleus.

Therefore, the combination of these two assays in the present work proved to be both adequate and useful in the evaluation of the genotoxicity of the extracts from *Miconia* species due to their complementary action.

Cyclophosphamide is an alkylating agent that after administration is widely distributed throughout the body with a low degree of plasma protein binding (20%). Once activated, it can, besides causing monoadducts, also induce the formation of DNA-DNA and DNA-protein crosslinks (31) and generate free radicals that cause reactive species in a second mechanism for damaging DNA (32). Consequently, CPA has been used as a clastogenic agent to induce cellular damage in the micronucleus test for evaluating mutagenic and antimutagenic activities (33).

In the present study, the protective effects of the *Miconia* extracts against DNA damage induced by CPA were observed via the comet assay and in the MN assay. These effects can be explained as being due to the chemical constituents present in the extracts. The chemical analysis showed that polyphenols are the main compounds of *Miconia cabucu* (Rodrigues et al., 2007), *M. rubiginosa* and *M. stenostachya* (unpublished data). And these analyses show that they are chemically similar what justifies the similarities of results observed in our study.

According to Scalbert and Williamson (2000) (34), a major part of the polyphenols ingested (75-99%) is not found in urine and bioavailability studies have shown that the maximum flavonoids concentrations are most often reached 1-2 hours after ingestion, except to polyphenols which are absorbed only after parcial degradation by the colon microflora. According Anderson et al (1995) (33), the CPA peak concentrations in the blood plasma occurs about one hour after the administration. Therefore, being the metabolism of cyclophosphamide faster than that of the components of the extracts used, the interval of one

hour between CPA injection and the administration of extracts aimed to put the CPA and extracts metabolites in contact at the same time in blood plasma.

A wide variety of botanical material, mostly dietary flavonoids or phenolic substances, have been reported to possess substantial anticarcinogenic and antimutagenic activities because of their antioxidant and anti-inflammatory properties (35). As antioxidants, the flavonoids are capable of inhibiting the formation of free radicals and also eliminate them by donating atoms of hydrogen to these molecules and interrupting the chain reaction (36).

Phenolic compounds, as such, are found naturally in various agricultural products, such as coffee beans, fruits, vegetables, tobacco leaves, olive oils and wines (37). Caffeic acid, one phenolic compound well studied, exhibits a cytoprotective effect on endothelial cells against oxidized low-density lipoprotein (38). It also inhibits the oxidation of lipoprotein exposed to ferrylmyoglobin and recycles α -tocopherol from α -tocopherol radicals (39). Similarly to other phenolic acids (ferulic and gentisic acids), caffeic acid exhibited a protective effect against the genotoxicity of acridine orange and ofloxacin in *Salmonella typhimurium* (13).

Tannins are one such class of compound that is suspected of possessing protective properties (14). Fedeli et al. (40) showed that, at low concentrations, tannins are capable of protecting against DNA breakage, while at high concentrations they could be genotoxic. Chen and Chung (41) showed the protective effect of tannins against the mutagenicity induced by agents, which, like CPA, show indirect mutagenicity: benzidine, 4-aminobi-phenyl, 3,3'-4,4'-tetraaminobiphenyl, and N,N- N',N'-tetramethylbenzidine. Several authors also have shown that ellagic acid, a tannin detected in the chemical analyses of *Miconia* extracts, presents protective effects to different types of cells treated with different mutagenic agents (42-43).

Compounds similar to those detected in the chemical analysis of the extracts used in the present study showed mutagenic activity when assessed separately and in high concentrations. Therefore, the absence of mutagenicity observed in this study for all the extracts assessed in acute tests is probably due to the low concentration of these compounds or to the interaction between them. Further studies (sub-chronic and chronic treatments) still need to be conducted to confirm the absence of mutagenic effects of the extracts and allow their safe indication of the use.

The additive and synergistic effects of phytochemicals in fruit and vegetables also have been proposed as being responsible for their potent antioxidant and anticancer activities (44). Among the distinguished compounds detected in the *Miconia* extracts are tannins, phenolic acids and flavonoids, which have been described as antimutagenic agents when

assessed separately. Their interactions and possible synergistic effects may facilitate the protective effects observed.

Acknowledgements

The authors would like to thank the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) for the financial support of the Biota-Fapesp Program; the Conselho Nacional para o Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq/PIBIC) for fellowship to Reis, MB and grant to Vilegas, W. and Varanda, EA.; the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES/DS) for fellowship to Serpeloni, JM and Rodrigues, J.

References

1. Lopes,L.C., Albano,F., Laranja,G.A.T., Alves,L.M., Silva,L.F.M., Souza,G.P., Araujo,I.M., Nogueira-Neto,J.F., Felzenszwalb,I. and Kovary, K. (2000). Toxicological evaluation by *in vitro* and *in vivo* assays of an aqueous extract prepared from *Echinodorus macrophyllus* leaves. *Toxicol. Lett.*, **1161**, 189-198.
2. Renner,S.S. (1993). Phylogeny and classification of the Melastomataceae and Memecylaceae. *Nord. J. Bot.*, **13**, 519-540.
3. Judd,W.S. and Skee n Jr.,J.D. (1991). Taxonomic studies in Miconiaceae (Melastomataceae). *Bull. Florida Mus. Nat. Hist.*, **36**, 25-84.
4. Vasconcelos,M.A., Ferreira,D.S., Andrade e Silva,M.L., Veneziani,R.C. and Cunha,W.R. (2003). Analgesic effects of crude extracts of *Miconia albicans* (Melastomataceae). *Boll. Chim. Farm.*, **142**, 333-335.
5. Andrade e Silva,M.L., Cunha, W.R., Pedro,C., Aparecida Garcia,P. and Martins,C. (2002). Evaluation of the analgesic activity of an ethanol extract of *Miconia fallax*. *Boll. Chim. Farm.*, **141**, 158-160.

6. Spessoto, M.A., Ferreira, D.S., Crotti, A.E., Silva, M.L. and Cunha, W.R. (2003). Evaluation of the analgesic activity of extracts of *Miconia rubiginosa* (Melastomataceae). *Phytomedicine*, **10**, 606-609.
7. Cunha, W.R., Martins, C., da Silva Ferreira, D., Crotti, A.E., Lopes, N.P. and Albuquerque, S. (2003). *In vitro* trypanocidal activity of triterpenes from *Miconia* species. *Planta Med.*, **69**, 470-472.
8. Li, X.C., Jacob, M.R., Pasco, D.S., ElSohly, H.N., Nimrod, A.C., Walker, L.A. and Clark, A.M. (2001). Phenolic compounds from *Miconia myriantha* inhibiting *Candida aspartic* proteases. *J. Nat. Prod.*, **64**, 1282-1285.
9. Melo, A.M., Jardim, M.L., De Santana, C.F., Lacet, Y., Lobo Filho, J. and De Lima e Ivan Leoncio, O.G. (1974). First observations on the topical use of Primin, Plumbagin and Maytenin in patients with skin cancer. *Rev. Inst. Antibiot. (Recife)*, **14**, 9-16.
10. De Flora, S., Izzotti, A., Randerath, K., Randerath, E., Bartsch, H., Nair, J., Balansky, R., van Schooten, F., Degan, P., Fronza, G., Walsh, D. and Lewtas, J. (1996). DNA adducts and chronic degenerative diseases. Pathogenetic relevance and implications in preventive medicine. *Mutat. Res.*, **366**, 197-238.
11. Tamimi, R.M., Lagiou, P., Adami, H.O. and Trichopoulos, D. (2002). Prospects for chemoprevention of cancer. *Journl. Intern. Med.*, **251**, 286-300.
12. Park, E.J. and Pezzuto, J.M. (2002). Botanicals in cancer chemoprevention. *Cancer Metast. Rev.*, **21**, 231-55.
13. Belicová, A., Krizková, L., Nagy, M., Krajcovic, J. and Ebringer, L. (2001). Phenolic acids reduce the genotoxicity of acridine orange and ofloxacin in *Salmonella typhimurium* TA 102. *Folia Microbiol.*, **47**, 511-514.
14. Huang, M.T., Chang, R.L., Wood, A.W., Newmark, H.L., Sayer, J.M., Yagi, H., Jerina, D.M. and Conney, A.H. (1985). Inhibition of the mutagenicity of the bay region diol epoxides of

polycyclic hydrocarbons by tannic acid, hydroxylated anthraquinones and hydroxylated cinnamic acid derivatives. *Carcinogenesis*, **6**, 237-242.

15. Wiseman,S.A., Balentine,D.A. and Frei,B. (1997). Antioxidants of tea. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **37**, 705-718.

16. Kaur,S.J., Grover,I.S. and Kumar,S. (2000). Modulatory effects of a tannin fraction isolated from *Terminalia arjuna* on the genotoxicity of mutagens in *Salmonella typhimurium*. *Food Chem. Toxicol.*, **38**, 1113-1119.

17. Poersch,A., dos Santos,F.V., Maciel,M.A., de Câmara,J.K., de Castro Dantas,T.N. and de Syllos Cólus,I.M. (2007). Protective effect of DCTN (trans-dehydrocrotonin) against induction of micronuclei and apoptosis by different mutagenic agents *in vitro*. *Mutat. Res.*, **20**, 14-23.

18. Olfert,E.D., Cross,B.M. and McWilliam,A.A. (1993). *Guide to the care and use of experimental animals*. 2nd. Ottawa: Canadian Council on Animal Care.

19. Wagner,H., Blatt,S. and Zgainsky,E. (1984). Plant drug analysis. In: *A Thin. Layer Chromatography Atlas*. Berlin: Springer, p. 163-192.

20. Singh,N.P., McCoy,M.T., Tice,R.R. and Schneider,E.L. (1988). A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell. Res.*, **175**, 184-491.

21. Da Silva,J., Freitas,T.R.O., Marinho,J.R., Speit,G. and Erdtmann,B. (2000). An alkali single-cell gel eletroforesis (comet) assay for environmental biomonitoring with native rodents. *Genet. Mol. Biol.*, **23**, 241-245.

22. Nessler,F., Zennouche,N., Simar-Meintieres,S., Talahari,I., NKili-Mboui,E.N. and Marzin, D. (2007). *In vivo* Comet assay on isolated kidney cells to distinguish genotoxic carcinogens from epigenetic carcinogens or cytotoxic compounds. *Mutat. Res.*, **630**, 28-41.

23. Kobayashi,H., Sugiyama,C., Morikawa,Y., Hayashy,M. and Sofuni,T. (1995). A comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the single cell gel electrophoresis assay. *MMS Commun.*, **3**, 103-115.
24. Manoharan,K. and Banerjee,M.R. (1985). β -Carotene reduces sister chromatid exchange induce chemical carcinogens in mouse mammary cells in organ culture. *Cell Biol. Int. Rep.*, **9**, 783-789.
25. Waters,M.D., Brady,A.L., Stack,H.F. and Brockman,H.E. (1990). Antimutagenic profiles for some model compounds. *Mutat. Res.*, **238**, 57-85.
26. Hayashi,M., Morita,T., Kodama,Y., Sofuni,T. and Ishidate,Jr,M. (1990). The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides. *Mutat. Res.*, **245**, 245-249.
27. Rodrigues,J., Rinaldo,D., dos Santos,L.C. and Vilegas, W. (2007). An unusual C₆-C_{6'} linked flavonoid of *Miconia cabucu* (Melastomataceae). *Phytochemistry*, **68**, 1781-1784.
28. Rodeiro,I., Cancino,L.; González,J.E., Morffi,J., Garrido,G., González,R.M., Nuñez,A. and Delgado,R. (2006). Evaluation of the genotoxic potential of *Mangifera indica* L. extract (Vimang), a new natural product with antioxidant activity. *Food Chem. Toxicol.*, **44**, 1707-1713.
29. Collins,A.R., Duthie,S.J. and Dobson,V.L. (1993). Direct enzymic detection of endogenous oxidative base damage in human lymphocyte DNA. *Carcinogenesis*, **14**, 1733-1735.
30. Brendler-Schwaab,S., Hartmann,A., Pfuhrer,S. and Speit,G. (2005) .The *in vivo* comet assay: use and status in genotoxicity testing. *Mutagenesis*, **20**, 245-254.
31. Vrzoc,M. and Petras,M.L. (1997). Comparison of alkaline cell gel comet and peripheral blood micronucleus assay in detecting DNA damage caused by direct and indirect acting mutagens. *Mutat. Res.*, **381**, 31-40.

32. Matalon,S.T., Orney,A. and Lishner,M. (2004). Review of the potential effects of three commonly used antineoplastic and immunosuppressive drugs (cyclophosphamide, azathioprine, doxorubicin on the embryo and placenta). *Reprod. Toxicol.*, **18**, 219- 230.
33. Anderson,D., Bishop,J.B., Garner,R.C., Ostrosky-Wegman,P. and Selby,P.B. (1995). Cyclophosphamide: review of its mutagenicity for an assessment of potential germ cell risks. *Mutat. Res.*, **330**, 115-181.
34. Scalbert, A. and Williamson, G. (2000). Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J. nutr.* **130**, 2073-2085.
35. Baliga,M.S. and Katiyar,S.K. (2006). Chemoprevention of photocarcinogenesis by selected dietary botanicals. *Photochem. Photobiol. Sci.*, **5**, 243-253.
36. Namiki,M. (1990). Antioxidants/antimutagens in food. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **29**, 273-300.
37. Woodring,P.J., Edwards,P.A. and Chisholm,M.G. (1990). A HPLC determination of nonflavonoid phenols in Vidal blank wine using electrochemical detection. *J. Agric. Food Chem.*, **38**, 729-732.
38. Vieira,O., Escarqueil-Blanc,I., Meilhac,O., Basile,J.P., Laranjinha,J., Almeida,L., Salvayre,R. and Negre-Salvayre,A. (1998). Effect of dietary phenolic compounds on apoptosis of human cultured endothelial cells induced by oxidized LDL. *Br. J. Pharmacol.*, **12**, 565-573.
39. Laranjinha,J., Vieira,O., Madeira,V. and Almeida,L. (1995). Two related phenolic antioxidants with opposite effects on vitamin E content in low density lipoprotein oxidized by ferrylmyoglobin: consumption vs. regeneration. *Arch. Biochem. Biophys.*, **323**, 373-381.
40. Fedeli,D., Berrettini,M., Gabryelak,T. and Falcioni,G. (2004). The effect of some tannins on trout erythrocytes exposed to oxidative stress. *Mutat. Res.*, **563**, 89-96.

41. Chen,S.C. and Chung,K.T. (2000). Mutagenicity and Antimutagenicity Studies of Tannic Acid and its Related Compounds. *Food Chem. Toxicol.*, **38**, 1-5.
42. Atessahin,A., Ceribasi,A.O., Yuce,A., Bulmus,O. and Cikim,G. (2007). Role of ellagic acid against cisplatin-induced nephrotoxicity and oxidative stress in rats. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.*, **100**, 121-126.
43. Kasai,K., Yoshimura,M., Koga,T., Arii,M. and Kawasaki,S. (2006). Effects of oral administration of ellagic acid-rich pomegranate extract on ultraviolet-induced pigmentation in the human skin. *J. Nutr. Sci. Vitaminol (Tokyo)*., **52**, 383-388.
44. Liu,R.H. (2004). Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. *J. Nutr.* **134**, 3479S-3485S.

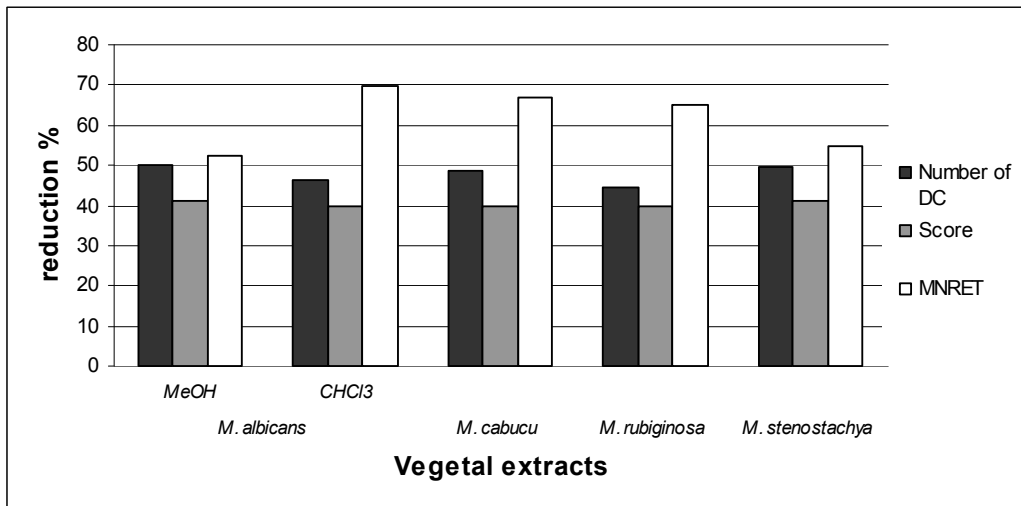


Fig. 1. Percentage of damage reduction offered by the extracts in the presence of the cyclophosphamide calculated according to the formula of Manoharan and Banerjee (23) and Waters et al. (24). The parameters shown are the average score, frequency of damaged cells and frequency of MNRET.

Table I. Detection of DNA damage using the comet assay of 100 white blood cells per mice (n=10 animals per group) exposed to water, Tween 8%, CPA and plant extracts of *Miconia* species and sampled at 24 hours (mean \pm standard deviation)

TREATMENTS	Levels of Damage				Score (Mean \pm SD)	Frequency of DC (Mean \pm SD)
	0	1	2	3		
Water	95.6 \pm 2.17	3.60 \pm 1.96	0.70 \pm 0.82	0.10 \pm 0.32	5.30 \pm 2.91 ^a	0.04 \pm 0.02 ^a
Tween 8%	96.4 \pm 2.67	3.00 \pm 2.31	0.50 \pm 0.53	0.00 \pm 0.00	4.00 \pm 2.71 ^a	0.04 \pm 0.02 ^a
CPA 40 (mg/kg b. w.)	20.6 \pm 3.92	52.7 \pm 3.95	23.5 \pm 4.88	3.20 \pm 1.48	109.1 \pm 9.50 ^b	0.79 \pm 0.04 ^b
Plant Extracts (mg/kg b.w.)						
<i>M. albicans</i>						
EMeOH 200	84.7 \pm 3.23	14.0 \pm 3.46	1.30 \pm 1.16	0.00 \pm 0.00	16.4 \pm 3.37 ^c	0.15 \pm 0.03 ^c
EMeOH 400	85.8 \pm 4.08	13.5 \pm 4.38	0.70 \pm 0.67	0.00 \pm 0.00	14.9 \pm 3.87 ^c	0.14 \pm 0.04 ^c
EMeOH 540	86.5 \pm 3.41	12.6 \pm 3.53	0.90 \pm 0.74	0.00 \pm 0.00	14.2 \pm 3.65 ^c	0.14 \pm 0.03 ^c
<i>ECHCl₃</i>						
ECHCl ₃ 200	80.0 \pm 1.83	17.4 \pm 3.20	1.70 \pm 1.64	0.50 \pm 0.53	23.1 \pm 2.23 ^d	0.20 \pm 0.02 ^d
ECHCl ₃ 400	79.9 \pm 3.48	18.5 \pm 3.24	1.40 \pm 0.52	0.30 \pm 0.48	22.2 \pm 3.97 ^{c,d}	0.20 \pm 0.03 ^{c,d}
ECHCl ₃ 540	81.5 \pm 3.10	16.8 \pm 3.19	1.40 \pm 1.07	0.40 \pm 0.52	20.8 \pm 3.49 ^{c,d}	0.19 \pm 0.03 ^{c,d}
<i>M. cabucu</i>						
EMeOH 200	84.1 \pm 4.36	15.0 \pm 4.81	1.63 \pm 1.06	0.00 \pm 0.00	18.5 \pm 4.96 ^{c,d}	0.17 \pm 0.05 ^{c,d}
EMeOH 400	83.0 \pm 4.33	15.3 \pm 4.00	1.67 \pm 1.12	0.00 \pm 0.00	18.7 \pm 4.90 ^{c,d}	0.17 \pm 0.04 ^{c,d}
EMeOH 540	83.9 \pm 3.89	14.8 \pm 4.44	1.33 \pm 1.00	0.00 \pm 0.00	17.4 \pm 3.54 ^{c,d}	0.16 \pm 0.04 ^{c,d}
<i>M. rubiginosa</i>						
EMeOH 200	82.5 \pm 2.92	15.2 \pm 2.62	2.00 \pm 1.05	0.30 \pm 0.67	20.1 \pm 3.81 ^{c,d}	0.18 \pm 0.03 ^{c,d}
EMeOH 400	83.5 \pm 3.87	14.5 \pm 3.72	2.00 \pm 0.82	0.00 \pm 0.00	18.5 \pm 4.27 ^{c,d}	0.17 \pm 0.04 ^{c,d}
EMeOH 540	82.1 \pm 2.76	15.3 \pm 2.65	1.89 \pm 0.78	0.67 \pm 0.50	21.11 \pm 3.55 ^{c,d}	0.18 \pm 0.03 ^{c,d}
<i>M. stenostachya</i>						
EMeOH 200	81.3 \pm 2.83	17.2 \pm 3.01	1.30 \pm 1.16	0.20 \pm 0.42	20.4 \pm 3.20 ^{c,d}	0.19 \pm 0.03 ^{c,d}
EMeOH 400	83.8 \pm 3.49	15.8 \pm 3.79	0.30 \pm 0.48	0.10 \pm 0.32	16.7 \pm 3.23 ^{c,d}	0.16 \pm 0.03 ^{c,d}
EMeOH 540	81.8 \pm 2.44	16.7 \pm 2.11	1.50 \pm 1.18	0.00 \pm 0.00	18.7 \pm 2.49 ^{c,d}	0.18 \pm 0.02 ^{c,d}

SD = Standard deviation

DC = Damaged cells

EMeOH: methanol extract; ECHCl₃: chloroform extract;

Water: negative control; Cyclophosphamide (CPA): positive control; Tween 8%: solvent control.

Means with the same letter do not differ statistically (p>0.05).

Table II: Frequency of MNRETs for a total of 1000 analyzed cells per animal in each acute treatment to evaluate the mutagenicity of three different doses of the extracts of *Miconia* species and their positive and negative control groups

TREATMENTS (mg/kg b. w.)	Number of animals	CONTROL (T ₀)		30 Hours (T ₁)		
		MNRETs	(Mean ± SD)	MNRETs	(Mean ± SD)	
Water	10	13	1.3 ± 0.67	13	1.3 ± 0.82 ^a	
Tween 8%	10	11	1.1 ± 0.62	16	1.6 ± 0.69 ^a	
CPA 40 mg/Kg p.c	10	10	1.0 ± 0.66	195	19.5 ± 3.06 ^b	
Plant Extracts (mg/kg b. w.)						
<i>M. albicans</i>						
200	9	11	1.2 ± 0.83	20	2.2 ± 0.83 ^a	
EMeOH	400	9	16	1.8 ± 1.20	22	2.4 ± 0.73 ^a
	540	9	21	2.3 ± 1.12	9	1.8 ± 0.84 ^a
	200	10	13	1.3 ± 0.48	14	1.4 ± 1.08 ^a
ECHCl ₃	400	10	10	1.0 ± 0.82	10	1.6 ± 0.97 ^a
	540	10	16	1.6 ± 0.97	16	1.6 ± 0.70 ^a
	<i>M. cabucu</i>					
200	10	16	1.6 ± 0.70	17	1.7 ± 0.90 ^a	
EMeOH	400	9	9	1.6 ± 0.88	9	1.9 ± 0.78 ^a
	540	10	12	1.2 ± 1.03	17	1.7 ± 0.95 ^a
<i>M. rubiginosa</i>						
200	9	11	1.2 ± 0.67	13	1.4 ± 0.73 ^a	
EMeOH	400	10	12	1.2 ± 0.92	14	1.4 ± 0.52 ^a
	540	10	12	1.2 ± 0.92	16	1.6 ± 0.97 ^a
<i>M. stenostachya</i>						
200	10	12	1.2 ± 0.91	10	1.0 ± 0.94 ^a	
EMeOH	400	10	11	1.1 ± 0.56	13	1.3 ± 0.95 ^a
	540	8	9	1.1 ± 0.64	9	1.1 ± 0.84 ^a

SD = Standard deviation

EMeOH: methanol extract; ECHCl₃: chloroform extract;

Water: negative control; Cyclophosphamide (CPA): positive control; Tween 8%: solvent control.

Means with the same letter do not differ statistically (p>0.05).

Table III. Detection of DNA damage using the comet assay of 100 white blood cells per mice (n=10 animals per group) exposed to water, Tween 8%, CPA and vegetal extracts of *Miconia* species associated with CPA and sampled at 24 hours (mean \pm standard deviation)

TREATMENTS	Levels of Damage				score (Mean \pm SD)	Frequency of DC (Mean \pm SD)
	0	1	2	3		
Water	95.6 \pm 2.17	3.60 \pm 1.96	0.70 \pm 0.82	0.10 \pm 0.32	5.30 \pm 2.91 ^a	0.04 \pm 0.02 ^a
Tween 8%	96.4 \pm 2.67	3.00 \pm 2.31	0.50 \pm 0.53	0.00 \pm 0.00	4.00 \pm 2.71 ^a	0.04 \pm 0.02 ^a
CPA 40 (mg/kg b. w.)	20.6 \pm 3.92	52.7 \pm 3.95	23.5 \pm 4.88	3.20 \pm 1.48	109.1 \pm 9.50 ^b	0.79 \pm 0.04 ^b
Tween 8% + CPA 40	22.7 \pm 3.35	52.0 \pm 3.08	22.2 \pm 4.35	3.11 \pm 1.45	104.7 \pm 8.43 ^b	0.77 \pm 0.03 ^b
Plant Extracts + CPA 40						
<i>M. albicans</i> EMeOH 540	51.6 \pm 5.42	41.3 \pm 4.10	5.38 \pm 2.13	1.75 \pm 0.89	57.3 \pm 7.89 ^c	0.48 \pm 0.05 ^c
<i>M. albicans</i> ECHCl₃ 540	50.7 \pm 3.64	39.9 \pm 2.85	7.33 \pm 2.60	2.11 \pm 0.78	60.9 \pm 6.25 ^c	0.49 \pm 0.04 ^c
<i>M. cabucu</i> EMeOH 540	51.2 \pm 4.57	41.0 \pm 5.66	5.60 \pm 2.46	2.20 \pm 0.92	58.8 \pm 5.83 ^c	0.49 \pm 0.05 ^c
<i>M. rubiginosa</i> EMeOH 540	50.7 \pm 3.28	38.1 \pm 4.14	8.56 \pm 2.30	2.67 \pm 2.12	63.2 \pm 7.21 ^c	0.49 \pm 0.03 ^c
<i>M. stenostachya</i> EMeOH 540	51.6 \pm 5.98	41.1 \pm 5.22	5.50 \pm 1.78	1.80 \pm 1.14	57.5 \pm 8.24 ^c	0.48 \pm 0.06 ^c

SD = Standard deviation

DC = Damaged cells

EMeOH: methanol extract; ECHCl₃: chloroform extract;

Water: negative control; Cyclophosphamide (CPA): positive control; Tween 8%: solvent control.

Means with the same letter do not differ statistically (p>0.05).

Table IV. Frequency of MNRETs in a total of 1000 analyzed cells per animal in each acute treatment to evaluate the antimutagenicity of the extracts of *Miconia* species and their positive and negative control groups

TREATMENTS (mg/kg b. w.)	Number of animals	CONTROLE (T ₀)		30 Hours (T ₁)	
		MNRETs	(Mean ± SD)	MNRETs	(Mean ± SD)
Water	10	13	1.3 ± 0.67	13	1.3 ± 0.82 ^a
Tween 8%	10	11	1.1 ± 0.62	16	1.6 ± 0.69 ^a
CPA 40	10	10	1.0 ± 0.66	195	19.5 ± 3.06 ^b
Tween 8% + CPA 40	10	16	1.6 ± 0.70	133	13.3 ± 3.53 ^c
Plant Extracts + CPA 40					
<i>M. albicans</i> MeOH 540	10	11	1.1 ± 0.57	100	10.0 ± 1.56 ^d
<i>M. albicans</i> CHCl ₃ 540	10	15	1.5 ± 0.97	68	6.8 ± 1.48 ^e
<i>M. cabucu</i> MeOH 540	10	17	1.7 ± 0.67	73	7.3 ± 1.64 ^e
<i>M. rubiginosa</i> MeOH 540	10	16	1.6 ± 0.70	77	7.7 ± 2.63 ^e
<i>M. stenostachya</i> MeOH 540	10	16	1.6 ± 0.70	95	9.5 ± 2.01 ^{d,e}

SD = Standard deviation

EMeOH: methanol extract; ECHCl₃: chloroform extract;

Water: negative control; Cyclophosphamide (CPA): positive control; Tween 8%: solvent control.

Means with the same letter do not differ statistically (p>0.05).

3.2 ARTIGO 2

**Evaluation of mutagenic effects of vegetal extracts from *Guapira*, *Indigofera* and
Miconia species**



Artigo submetido à Revista Journal of Ethnopharmacology

ISSN: 0378-8741

Impact factor: 1.625

**Evaluation of mutagenic effects of vegetal extracts from *Guapira*, *Indigofera* and
Miconia species**

Juliana Mara Serpeloni^{a*}, Mariana Bisarro dos Reis^a, Juliana Rodrigues^b, Juliana A. Severi^b,
Tamara R. Calvo^b, Anne L. Dokkedal^c, Lurdes C. Santos^b Wagner Vilegas^b, Eliana A.
Varanda^d, Ilce M. Syllos Cólus^a

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

^b *Department of Organic Chemistry, Institute of Chemistry, Araraquara, São Paulo State
University, Araraquara, SP, Brazil.*

^c *Department of Biological Sciences, Faculty of Sciences, São Paulo State University, Bauru,
SP, Brazil*

^d *Department of Biological Sciences, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Araraquara, São
Paulo State University, Araraquara, SP, Brazil.*

*Corresponding author:

Departamento de Biologia Geral, Centro de Ciências Biológicas

Universidade Estadual de Londrina (UEL)

Campus Universitário

CEP 86051.990

Londrina PR, Brazil

Phone: 55.43.3371.4608

Fax: 55.43.3371.4527

E-mail: julianaserpeloni@yahoo.com.br

Abstract

While some herbs might be pharmacologically and clinically effective, they are not necessarily free of mutagenicity and side effects. Therefore, investigation into the traditionally used medicinal plants is valuable as a source of potential chemotherapeutic drugs and as a safety measure for the continued use of medicinal plants. The aim of this study was to evaluate six plant species belonging to *Indigofera*, *Miconia* e *Guapira* genera, all of them used in folk medicine. It was also to provide data regarding their possible mutagenic and cytotoxic effects in mice bone marrow cells from micronucleus testing. The citotoxicity of the extracts was evaluated from the percentage of polychromatic erythrocytes (PCE) in 200 erythrocytes. A total of 2000 cells of each animal were analyzed, and the frequencies of micronuclei in the PCEs were counted and the MNPCE frequencies were recorded. Only the highest dose of the extract from the *Guapira noxia* presented mutagenicity and none of the doses of the all extracts showed citotoxicity. The main constituents isolated from the extracts evaluated were flavonoids, saponins, tannins and phenolic compounds. The saponins were present only in the *Guapira noxia* extracts and may have been responsible for the mutagenic effect observed for this extract.

Keywords: Micronuclei; Mice; Vegetal extracts; Mutagenicity

1. Introduction

While some herbs might be pharmacologically and clinically effective, they are not necessarily free of mutagenicity and side effects. Therefore, investigation into the traditionally used medicinal plants is valuable as a source of potential chemotherapeutic drugs and as a safety measure for the continued use of medicinal plants (Verschaeve et al., 2004).

The Nyctaginaceae family contains 30 genera and 390 herbaceous and shrub species found in tropical and subtropical regions (Di Stasi and Hiruma-Lima, 2002). Phytochemical investigation of plant extracts from this family is still scarce. There are some works in literature about *Boerhaavia diffusa* Linn. Hiruma-Lima (2002) reports as analgesic, anti-inflammatory and diuretic activities attributed to this specie. In *Bougainvillea spectabilis* Wild, several effects were detected, such as the inhibitory activity of the xanthine oxidase, the reduction of hepatitis and brain tumors, and the presence of flavonoids, coumarins and phenolic compounds (Chang et al., 1993). *Guapira noxia* (Netto) Lundell is a plant from this

family that is commonly known in Brazil as “Maria-mole” or “Capa-rosa” and is a typical species of the Brazilian savannah (Durigan *et al.*, 2004). There has been no chemical or biological study of this plant in literature; however, it is known for its use in folk medicine to treat gastrointestinal diseases.

Indigofera truxillensis Kunth, a typical Brazilian savanna plant, is a specie of the Fabaceae family. The Fabaceae family contains 482 genera and approximately 12000 species (Di Stasi and Hiruma-Lima, 2002). Plants belonging to the genus *Indigofera* are known to produce indigo (an ancient dye) and have attracted the attention of many investigators due to their medicinal properties (Chakrabarti *et al.*, 2006; Mathabe *et al.*, 2006). Together with the indigoid pigments, kaempferol derivatives are the major secondary metabolites of the *Indigofera* species (Hasan *et al.*, 1996). *I. truxillensis* is reported to be antiulcerogenic and antioxidant as demonstrated experimentally by Cola-Miranda *et al.*, (2006).

Miconia is a genus of approximately 1000 species occurring in tropical America and belonging to the family Melastomataceae, which is pan tropical, with over 166 genera that include about 4300 species (Renner, 1993). People living in Brazilian savannah area use many of these plants as medicine. *Miconia* extracts and isolated compounds have demonstrated antibiotic, antitumoral, analgesic and antimalarial activities (Hasrat, 1997; Cunha *et al.*, 2003).

Some biological activities have already been described for *Indigofera* and *Miconia* species but the *Guapira* genre has as yet been little studied. Therefore, the aim of this work is to contribute to the knowledge of the biological activities of six plant species belonging to *Guapira*, *Indigofera* and *Miconia* genus, commonly used in folk medicine, providing data about their mutagenicity and citotoxicity in mammalian cells *in vivo*.

2. Material and methods

2.1 Animals

Male and female albino Swiss mice (*Mus musculus*), five to six weeks old weighing approximately 30g, were used for the micronucleus test. They were obtained from the Central Animal Facility of the State University of Londrina (Paraná – Brazil) and were kept individually in polypropylene cages following the conditions for animal care recommended by the Canadian Council on Animal Care (Olfert *et al.*, 1993).

Three hundred and sixty animals were divided into groups of ten (five males and five females) for each treatment.

2.2 Plant material

Leaves of *Guapira noxia* (Netto) Lundell were collected in March of 2005 in Campinas, São Paulo State, Brazil. Aerial parts of *Indigofera truxillensis* Kunth plants were collected in April of 2005 Rubião Júnior, Botucatu, São Paulo State, Brazil and aerial parts of *Miconia cabucu* Hoehne were collected in April of 2005 at Pariquera-Açu, São Paulo State, Brazil. The plants were authenticated by Dr. Jorge Yoshio Tamashiro. A voucher specimen of *G. noxia* (HUEC 1435), *I. truxillensis* (HUEC 131827) and *M. cabucu* (HUEC 1430) were deposited at the Herbarium of the Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), SP, Brazil.

Miconia rubiginosa (Bonpl.) DC (voucher BOTU 25.376) and *M. stenostachya* Schrank & Mart (voucher BOTU 25.377) were collected in March of 2005 at Palmeiras da Serra, Pratânia, São Paulo State, Brazil and authenticated by Luiz Fernando Rolim de Almeida. Voucher specimens were deposited at the Herbarium “Irina Delanova Gemtchujnicov” BOTU of the Instituto de Biociências, UNESP, Botucatu, SP, Brazil.

Miconia albicans (Sw.) Triana were collected in March of 2005 in São Paulo State University (UNESP), campus of Bauru (São Paulo, Brazil) and identified by Dra. Anne L. Dokkedal. A voucher specimen is deposited in the Herbarium of Biology Department of UNESP/Bauru under number ALD 145.

2.3 Extract preparation

The aerial parts were dried (at 40 °C, for 4 days) and powdered. The powdered dried material was macerated with 2 L of chloroform, methanol and 70% methanol, successively at room temperature (3 times and for 48 hour for each solvent). Solvents were filtered and evaporated at 35°C under reduced pressure affording CHCl₃, MeOH and MeOH70 extracts, respectively. Table 1 shows the extract yield of the species studied in this work.

2.4 Chromatographic analysis of the species studied

The chemical constituents present in the extracts of the species studied were identified according to the method of Wagner *et al.* (1984). The compounds present in each extract are showed in Table 2.

2.5 Experimental design

The animals were treated with each of the solutions used in a ratio of 0.1 ml for each 10g body weight. They also received water and food *ad libitum* throughout the treatment

period. To evaluate the mutagenicity in bone marrow cells, the extracts were assessed in three different doses: 200, 400 and 540 mg/kg b.w. via gavage. These doses were based on the solubility limit of the extract in distilled water. Due to the low solubility of the CHCl₃ extract, it was diluted in Tween 8%.

A positive and a solvent control group were established for the treatment of the animals with distilled water, cyclophosphamide (40 mg/kg b.w.) and Tween 8%. Cyclophosphamide (Sigma – CAS: 50-18-0) was diluted in distilled water and was administrated intraperitoneally in a single dose.

2.6 Micronucleus test

The bone marrow preparations for the micronuclei analysis were made according to Schmid (1975) with some modifications.

Animals were euthanized at 30 hours after the treatments and immediately after this, both femurs of the mice were removed and the femur bone was freed from the extra muscles. The epiphyses were cut and the bone marrow was flushed out with fetal calf serum (Gibco). The cell suspension was centrifuged at 900 rpm for 10 min and the supernatant was discarded. A small drop of the resuspended cell pellet was spread on to clean glass slides and air-dried. The bone marrow smears were replicated twice and fixed in absolute methanol for 10 minutes and stained with giemsa 5% at pH 6.8. On each slide 1000 cells were counted and classified as polychromatic erythrocytes (PCE) and normochromatic erythrocyte (NCE). The micronucleus frequency was observed only in the PCEs. Also, the PCEs were given score out of 200 erythrocytes for each animal to determine the ratio PCE/PCE + NCE.

Data were analyzed using ANOVA and Tukey at the 0.05 level of significance.

3. Results

Table 3 show the results obtained from the mice bone marrow cells analysis after the treatment with the extracts from *Guapira noxia*, *Indigofera truxillensis* and *Miconia* species and with their control groups (negative and positive).

Only the 400 and 540 mg/kg b.w. doses of the CHCl₃ extract and the 540 mg/kg b.w. dose of the MeOH 70% extract of *Guapira noxia* (Netto) Lundell presented frequencies of micronucleated cells significantly higher than those found in the negative control. The remaining doses of these extracts and of the MeOH extract from this same species did not increase the micronucleus frequency.

The three tested doses of the MeOH and CHCl₃ extracts of *Indigofera truxillensis* were not able to raise the micronucleus frequency in relation to the negative control and are, as such, free of mutagenic activity. The same result was found for the three doses of the five extracts obtained from the species of the genus *Miconia*.

PCE/PCE + NCE ratio showed that the extracts at even higher doses along with the positive control did not presented cytotoxic effects in mice bone marrow cells (Table 3).

4. Discussion

There are several reports on plant extracts exhibiting mutagenic and/or genotoxic effects (Schimmer et al., 1994 and Déciga-Campos et al., 2007). Quercetin, furoquinoline alkaloids and isothiocyanates are considered to be among the possible mutagens originating from plants (Kassie et al., 1996). However, there are no reports on mutagenic compounds isolated from the plant extracts investigated in this study.

The evaluation of micronucleus frequencies *in vivo* is one of the primary genotoxicity tests recommended internationally by regulatory agencies for product safety assessment. An increase in the frequency of micronucleated polychromatic erythrocytes (MNPCEs) in treated mice is an indication of induced chromosome damages (Krishna & Hayashi, 2000). Data obtained from micronucleus test in this work showed a moderate mutagenicity only for the 400 and 540 mg/kg b.w. doses of the CHCl₃ extract and the 540 mg/kg b.w. dose of the MeOH 70% extract, both obtained from *Guapira noxia* (Netto) Lundell.

Erythropoiesis is an ongoing process, and there is a continual progression of cells from erythroblasts through the PCE stage to NCE. A considerable fraction of MNPCE migrates to the peripheral blood soon after their formation in the bone marrow, before maturing into NCEs. Some of the PCEs do mature into NCEs in the bone marrow itself and then migrate to the peripheral blood (Venkatesh, 2007). The PCE/NCE ratio is an indicator of the acceleration or inhibition of erythropoiesis. The PCE/NCE ratio has been reported to vary with scoring time, and the continuous decline in the PCE/NCE ratio may be due to the inhibition of cell division, killing of erythroblasts, removal of damaged cells, and/or dilution of the existing cell pool with newly formed cells (Al-Harbi, 1993).

In the citotoxic evaluation, none of the extracts assessed in the present study reduced the PCE frequency in relation to total cells analyzed (PCEs + NCEs). Cytotoxicity of the cyclophosphamide in the dose utilized in this work (40 mg/ kg b.w.) was not observed. Grisolia (2002) also did not observe citotoxicity for the CPA in the dose of 30 mg/kg b. w.

Both works had as their aim the evaluation of mutagenicity and, in these cases, it is necessary that the dose of the compound utilized in the positive control group be free of cytotoxicity in order not to interfere in the results of mutagenicity. However, this property was reported when employed high doses of this alkylating agent as Erexson (2003) who used CPA in a dose of 80 mg/kg b. w.

The chemical constituents present in the extracts of the species studied were identified according to the method of Wagner et al. (1984) and are shown in Table 2. The main constituents isolated were flavonoids, saponins, tannins and phenolic compounds. Plant flavonoids are common dietary components that have many potent biological properties. Quercetin also has an anti-oxidative capacity (Burda and Oleszek, 2001). However, at higher doses, flavonoids may act as mutagens, pro-oxidants that generate free radicals, and as inhibitors of key enzymes involved in hormone metabolism. Thus, in high doses, the adverse effects of flavonoids may outweigh their beneficial ones, and caution should be exercised in ingesting them at levels above that which would be obtained from a typical vegetarian diet (Skibola and Smith, 2000).

Tannins are water-soluble polyphenols that are present in many plant foods. Incidences of certain cancers, such as esophageal cancer, have been linked to the consumption of tannin-rich foods such as betel nuts and herbal teas, suggesting that tannins might be carcinogenic. However, other reports indicate that the carcinogenic activity of tannins might be related to components associated with tannins rather than the tannins themselves (Chung et al., 1998). Condensed tannins induce micronuclei in other mammalian cells (Sanyal et al., 1997). It is known that tannic acid, a structural component of tannins, in presence of metal (Cu^{2+}) induces DNA degradation by generating a reactive oxygen species (Khan and Hadi, 1998). According to these authors, the mutagenicity of tannins greatly depends on their structural characteristics.

Guapira noxia was the only specie of this study that presented mutagenicity in some of the doses evaluated of its extracts. The presence of saponins in *Guapira noxia* extracts distinguishes it from the others. Saponins constitute a vast group of glycosides, which occur in many plants. They are characterized by their surfactant properties; they dissolve in water and when shaken, form a foamy solution (Gurib-Fakim, 2006). Saponins have been isolated and identified from alfalfa roots and clover *Trifolium incarnatum* seeds and, when they were tested for mutagenicity, all of them were found to be non-toxic and non-mutagenic for the doses tested (Czeczot et al, 1994). Many saponins have been evaluated for other biological activities and have presented hemolytic properties and toxicity to cold-blooded animals

especially fish (Gurib-Fakim, 2006). In the studies cited, the saponin was evaluated on its own, which makes its comparison with our data difficult, since it is one of the compounds of the crude extracts.

Thousands of phytochemicals are present in whole foods. These compounds differ in molecular size, polarity, and solubility, which may affect the bioavailability and distribution each phytochemical in different macromolecules, subcellular organelles, cells, organs, and tissues and the interaction of them with other compounds (Liu, 2004). To interpret our results it is necessary to consider the possible interaction between saponins and other compounds, because this interaction is probably responsible for the mutagenic effect observed for the *Guapira noxia* extract.

Acknowledgements

The authors would like to thank the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) for financial support of the Biota-Fapesp Program; the Brazilian Council for Scientific and Technological Development (CNPq) for their grant to Vilegas, W. and Varanda, E.A. and fellowship to Reis, MB; the Brazilian National Higher Education Coordinating Council (CAPES/DS) for the fellowship to Serpeloni, J.M.

References

- Al-Harbi, M.M., 1993. Effect of captropil on the cytological and biochemical changes induced by adriamycin. *Food and Chemical Toxicology* 31, 209-212.
- Burda, S., Oleszek, W., 2001. Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 49, 2774-2779.
- Chang, W.S., Lee, Y.J., Lu, F.J.; Chiang, H.C., 1993. Inhibitory effects of flavonoids on xanthine oxidase. *Anticancer Research* 13, 2165-2170.
- Chakrabarti, R., Damarla, R.K.B., Mullangi, R., Sharma, V.M., Vikramadithyan, R.K., Rajagopalan, R., 2006. Insulin sensitizing property of *Indigofera mysorensis* extract. *Journal of Ethnopharmacology* 105, 102-106.

Chung, K.T., Wong, T.Y., Wei, C.I., Huang, Y.W., Lin, Y., 1998. Tannins and human health: a review. *Critical Review In Food Science and Nutrition* 38, 421-464.

Cola-Miranda, M., Barbastefano, V., Hiruma-Lima, C.A., Calvo, T.R., Vilegas, W., Souza Brito, A.R.M., 2006. Antiulcerogenic activity of *Indigofera truxillensis* Kunth. *Biota Neotrop.* 6 (3). Disponível em : <http://www.biotaneotropica.org.br/>

Cunha, W.R., Martins, C., Ferreira, D.S., Crotti, A.E.M., Lopes, N.P., Albuquerque, S., 2003. *In vitro* trypanocidal activity of triterpenes from *Miconia* species. *Planta Medica* 69, 468-470.

Czeczot, H., Rahden-Stron, I., Oleszek, W., Jurzysta, M., 1994. Isolation and studies of the mutagenic activity of saponins in the Ames test. *Acta Poloniae Pharmaceutica* 51, 133-136.

Déciga-Campos, M., Rivero-Cruz, I., Arriaga-Alba, M., Castañeda-Corral, G., Angeles-López, G.E., Navarrete, A., Mata, R., 2007. Acute toxicity and mutagenic activity of Mexican plants used in traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology* 21, 110, 334-342.

Di Stasi, L.C., Hiruma-Lima, C.A., 2002. *Plantas Medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica*. Unesp, São Paulo. 604 p.

Durigan, G., Baitello, J.B., Franco, G.A.D.C., De Siqueira, M.F., 2004. *Plantas do cerrado paulista: imagens de uma paisagem ameaçada*. Páginas & Letras Editora, São Paulo.

Erexson, G. L., 2003. Lack of *in vivo* clastogenic activity of grape seed and grape skin extracts in a mouse micronucleus assay. *Food and Chemical Toxicology* 41, 347-350.

Grisolia, C. K., 2002. A comparison between mouse and fish micronucleus test using cyclophosphamide, mitomycin C and various pesticides. *Mutation Research* 518, 145 – 150.

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

Hasan, A., Ahmad, I., Khan, M.A., Chudhary, M.I., 1996. Two flavonol triglycosides from flowers of *Indigofera hebeptala*. *Phytochemistry* 43, 1115–1118.

Hasrat, J.A., De Backer, J. P., Valquelin, G., Vlietinck, A.J., 1997. Medicinal plants in Suriname: screening of plants extracts for receptobinding activity. *Phytomedicine* 4, 56-65.

Hiruma-Lima, C.A., Gracioso, J.S., Bighetti, E.J., Germonsen Robineu, L., Souza Brito, A. R., 2002. The juice of fresh leaves of *Boerhaavia diffusa* L. (Nyctaginaceae) markedly reduces pain in mice. *Journal of Ethnopharmacology* 71, 267-274.

Kassie, F., Parzefall, W., Musk, S., Johnson, I., Lamprecht, G., Sontag, G., Knasmuller, S., 1996. Genotoxic effects of crude juices from Brassica vegetables and juices and extracts from phytopharmaceutical preparations and spices of cruciferous plants origin in bacterial and mammalian. *Chemico- Biological Interactions* 102, 1-16.

Khan, N., Hadi, S., 1998. Structural features of tannic acid important for DNA degradation in the presence of Cu(II). *Mutagenesis* 13, 271-274.

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

Liu, R. H., 2004. Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. *The Journal of Nutrition*. Downloaded from www.jn.nutrition.org by on February 26, 2007.

Mathabe, M.C., Nikolova, R.V., Lall, N., Nyazema, N.Z., 2006. Antibacterial activities of medicinal plants used for the treatment of diarrhoea in Limpopo Province, South Africa. *Journal of Ethnopharmacology* 105, 286-293.

Olfert, E.D., Cross, B.M., McWilliam, A.A., 1993. *The guide to the care and use of experimental animals*. Canadian Council on Animal Care, Canadá.

Renner, S.S., 1993. Phylogeny and classification of the Melastomataceae and Memecylaceae. *Nordic Journal of Botany* 13, 519-540.

Sanyal, R., Darroudi, F., Parzefall, W., Nagao, M., Knasmuller, S., 1997. Inhibition of the genotoxic effects of heterocyclic amines in human derived hepatoma cells by dietary bioantimutagens. *Mutagenesis* 12, 297-303.

Schimmer, O., Krüger, A., Paulini, H., Haefele, F., 1994. An evaluation of 55 commercial plant extracts in the Ames mutagenicity test. *Pharmazie* 49(6), 448-451.

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

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

Venkatesh, P., Shantala, B., Jagetia, G.C., Rao, K.K.; Baliga, M.S., 2007. Modulation of doxorubicin-induced genotoxicity by *Aegle marmelos* in mouse bone marrow: A micronucleus study. *Integrative Cancer Therapies* 6, 42-53.

Verschaeve, L., Kestens, V., Taylor, J.L.S., Elgorashi, E.E., Maes, A., Puyvelde, L.V., Kimpe, D.N. & Staden, J.V., 2004. Investigation of the antimutagenic effects of selected South African medicinal plant extracts. *Toxicology In Vitro* 18, 29-35.

Wagner, H., Blatt, S., Zgainsky, E., 1984. *Plant drug analysis*. Springer, Berlin.

Table 1. Mass of the extract obtained from the species studied

Species	Dried plants (g)	Extracts (% yeld)		
		CHCl ₃	MeOH	MeOH70
<i>I. truxillensis</i>	500	2.7	6.9	ne
<i>G. noxia</i>	1000	4.7	9.6	5.6
<i>M. albicans</i>	500	3.1	15.0	ne
<i>M. cabucu</i>	600	ne	3.3	ne
<i>M. rubigibnosa</i>	500	ne	9.3	ne
<i>M. stenostachya</i>	500	ne	14.6	ne

ne: not studied

Table 2. Phytochemical screening of the species studied

Species	Alkaloids	Flavonoids	Triterpenes, Steroids	Saponins	Tannins	Phenolic acids
<i>I. truxillensis</i>	+	+	+	-	-	+
<i>G. noxia</i>	-	+	-	+	-	+
<i>M. albicans</i>	-	+	-	-	+	+
<i>M. cabucu</i>	-	+	-	-	+	+
<i>M. rubigibnosa</i>	-	+	-	-	+	+
<i>M. stenostachya</i>	-	+	-	-	+	+

+: presence; -: absence

Table 3. Polychromatic micronucleated erythrocytes (MNPCEs) from bone marrow, per 2000 analyzed cells, after the acute treatment (30 hours) with the different doses of the *Guapira* and *Indigofera* extracts and their positive and negative groups.

TREATMENTS		N	MNPCEs	Mean ± SD	PCEs/ PCEs +
(mg/kg b. w.)					NCEs
					Mean ± SD
Water		10	34	3.4 ± 1.27	0.586 ± 0.04
Tween 8%		10	27	2.7 ± 1.64	0.662 ± 0.06
CPA 40		10	353	35.3 ± 5.91	0.656 ± 0.1
Plant Extracts					
<i>G. noxia</i> MeOH	200	9	39	4.3 ± 1.12	0.589 ± 0.06
	400	10	37	3.7 ± 1.70	0.560 ± 0.06
	540	10	49	4.9 ± 1.60	0.614 ± 0.06
<i>G. noxia</i> CHCl ₃	200	10	53	5.3 ± 0.82	0.608 ± 0.05
	400	10	91	9.1 ± 1.91*	0.592 ± 0.07
	540	10	101	10.1 ± 1.10 *	0.642 ± 0.07
<i>G. noxia</i> MeOH 70%	200	10	44	4.4 ± 1.35	0.624 ± 0.06
	400	10	48	4.8 ± 0.63	0.615 ± 0.04
	540	10	81	8.1 ± 2.18*	0.640 ± 0.06
<i>I. truxillensis</i> MeOH	200	10	40	4.0 ± 1.49	0.635 ± 0.04
	400	10	30	3.0 ± 1.05	0.599 ± 0.07
	540	10	33	3.3 ± 1.06	0.667 ± 0.05
<i>I. truxillensis</i> CHCl ₃	200	10	38	3.8 ± 0.63	0.612 ± 0.05
	400	10	32	3.2 ± 0.42	0.620 ± 0.04
	540	10	32	3.2 ± 0.63	0.622 ± 0.07
<i>M. albicans</i> MeOH	200	10	34	3.4 ± 0.52	0.605 ± 0.053
	400	10	33	3.3 ± 0.95	0.639 ± 0.045
	540	10	28	2.8 ± 0.42	0.644 ± 0.031
<i>M. albicans</i> CHCl ₃	200	10	38	3.8 ± 0.92	0.584 ± 0.042
	400	10	35	3.5 ± 1.08	0.584 ± 0.052
	540	10	35	3.5 ± 0.85	0.595 ± 0.058
<i>M. cabucu</i> MeOH	200	9	35	3.9 ± 1.45	0.613 ± 0.09
	400	10	39	3.9 ± 0.88	0.564 ± 0.053
	540	9	31	3.4 ± 0.73	0.508 ± 0.073
<i>M. rubiginosa</i> MeOH	200	9	30	3.3 ± 0.07	0.524 ± 0.037
	400	9	28	3.1 ± 0.60	0.675 ± 0.109
	540	9	31	3.4 ± 0.97	0.599 ± 0.040
<i>M. stenostachya</i> MeOH	200	9	31	3.4 ± 0.73	0.659 ± 0.060
	400	10	23	2.3 ± 0.48	0.645 ± 0.049
	540	9	26	2.9 ± 0.93	0.646 ± 0.064

SD = Standard deviation ; N = Number of animals; MeOH = methanol extract; CHCl₃ = chloroform extract; MeOH 70% = methanol extract 70%; Water = negative control; Cyclophosphamide (CPA) = positive control; Tween 8% = solvent control.

* Values different from those obtained with negative control

3.3 ARTIGO 3

Teste do micronúcleo na avaliação da anticlastogenicidade de extratos de plantas medicinais do cerrado brasileiro



Artigo submetido à Revista Semina Ciências Biológicas e da Saúde

ISSN: 1679-0367 - Brasil

*Avaliação in vivo da anticlastogenicidade de extratos de plantas medicinais do gênero
Miconia através do teste do micronúcleo*

*In vivo evaluation of anticlastogenicity of extracts from medicinal plants of Miconia genus
using the micronucleus test*

Juliana Mara Serpeloni^{a1}, Wagner Vilegas^b, Eliana A. Varanda^c, Ilce Mara S. Cólus^{a2*}

^a *Departamento de Biologia Geral, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brasil.*

^b *Instituto de Química de Araraquara, Universidade Estadual de São Paulo, Araraquara, SP, Brasil*

^c *Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Universidade Estadual de São Paulo, Araraquara, SP, Brasil*

^{a1}: Aluna do Programa de Mestrado em Genética e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Londrina

Juliana Mara Serpeloni (julianaserpeloni@yahoo.com.br)

Rua Voluntários da Pátria, s/n

CEP: 86609-000

São Martinho – Rolândia – Paraná

Fone: (43) 3240 1112

^{a2}: Docente do Departamento de Biologia Geral da Universidade Estadual de Londrina

Categoria do Trabalho: artigo

Área de publicação: Ciências Biológicas e da Saúde

Classificação das áreas/sub-áreas do CNPq: Ciências Biológicas/Genética/Mutagenese

Resumo

O gênero *Miconia* possui aproximadamente 1000 espécies sendo que, para algumas, já foram descritas atividades biológicas como a analgésica e antimicrobiana. Esse trabalho teve como objetivo avaliar os possíveis efeitos protetores e citotóxicos dos extratos metanólicos de *M. albicans*, *M. cabucu*, *M. rubiginosa* e *M. stenostachya* e do extrato clorofórmico de *M. albicans* em células da medula óssea de camundongos na dose de 540 mg/kg p.c. Os extratos foram administrados via gavagem e a ciclofosfamida (CPA) foi aplicada intraperitonealmente 1h após a suplementação com os extratos. Todos os animais foram submetidos à eutanásia 30h após o tratamento. As células analisadas foram retiradas da medula óssea de acordo com protocolo descrito por Schmid (1975). A citotoxicidade dos extratos foi avaliada pela percentagem de eritrócitos policromáticos (PCE) em 200 eritrócitos (PCE + NCE). Foram analisados 2000 PCEs por animal e anotadas as frequências de MNPCEs. Os resultados obtidos mostraram que nenhum dos extratos associados à CPA apresentou efeito citotóxico e somente os extratos de *M. rubiginosa*, *M. stenostachya* mostraram efeito protetor ao DNA. A análise química dos extratos mostrou que as quatro espécies estudadas contêm, principalmente, flavonóides, compostos fenólicos e taninos. A caracterização fitoquímica desses extratos poderia contribuir para elucidação do efeito protetor apresentado somente pelas espécies *M. rubiginosa* e *M. stenostachya*, além de possibilitar o estudo de outras possíveis atividades terapêuticas.

Palavras-chave: Micronúcleo. Plantas medicinais. Anticlastogenicidade.

Abstract

The genus *Miconia* is comprised of approximately 1000 species, for some, has been described as the biological activities analgesic and anti-microbial. The aim of this study was to evaluate the possible protective and cytotoxic effects of the methanolic extracts from *M. albicans*, *M. cabucu*, *M. rubiginosa* e *M. stenostachya* and the chloroformic extract from *M. albicans* in mice bone marrow cells in the dose of 540 mg/kg b.w. The extracts were administered by gavage and the cyclophosphamide (CPA) was applied by ip. route one hour after the administration of the extracts. All animals were submitted to euthanasia 30 hours after the treatment. The analyzed cells were extracted from mice bone marrow according to protocol described by Schmid (1975). The cytotoxicity of the extracts was evaluated through the percentage of polychromatic erythrocytes (PCE) in 200 erythrocytes (PCE + NCE). Two

thousand cells of each animal were analyzed, and the frequencies of micronucleated polychromatic erythrocytes (MNPCEs) were scored. The results obtained indicated that none of the extracts associated with the CPA showed cytotoxic effect and only the extracts of *M. rubiginosa* and *M. stenostachya* showed protective effects to DNA. Chemical analyzes of the extracts showed that the four species studied contain, mainly, flavonoids, phenolic compounds and tannins. The phytochemical characterization of these extracts could contribute to elucidate the protective effect presented only for the *M. rubiginosa* e *M. stenostachya* species, besides to possibility the study of other therapeutic activities.

Keywords: Micronucleus. Medicinal plants. Anticlastogenicity.

1. Introdução

O uso de espécies vegetais para fins de tratamento e cura de doenças remonta ao início da civilização, desde o momento em que o homem começou um longo percurso de manuseio, adaptação e modificação destes recursos para seu próprio benefício. Atualmente, a natureza continua a ser uma grande fonte de medicamentos para a humanidade. Nos últimos 20 anos, o interesse pelas plantas medicinais tem aumentado o volume de investigações científicas sobre seus efeitos biológicos em seres humanos e animais (VEIGA JR. et al., 2005).

Para a Organização Mundial da Saúde, plantas medicinais são todas aquelas, silvestres ou cultivadas, que podem ser utilizadas como recurso para prevenir, aliviar, curar ou modificar um processo fisiológico normal ou patológico, ou como fonte de fármacos e de seus precursores (ARIAS, 1999), enquanto que fitoterápicos são produtos medicinais acabados e etiquetados, cujos ingredientes ativos são formados por partes aéreas ou subterrâneas de plantas, ou outro material vegetal, ou combinações destes, em estado bruto ou em formas de preparações vegetais. Por material vegetal se entendem sucos, resinas, óleos fixos, óleos voláteis e qualquer outro de natureza semelhante (OMS, 1991).

São vários os exemplos de medicamentos que foram desenvolvidos de fontes naturais, especialmente de plantas, incluindo, entre outros, a morfina, os curares, os digitálicos e muitos medicamentos usados no tratamento do câncer (vimblastina, vincristina e taxol), as estatinas usadas nas dislipidemias, os imunossuppressores e vários antibióticos. Atualmente, há um grande interesse das indústrias farmacêuticas pelo uso da biodiversidade como fonte de novos fármacos (CALIXTO, 2001).

O papel das plantas medicinais na quimioprevenção do câncer vem sendo muito investigado e apresenta resultados promissores. Quimioprevenção pode ser definida como

inibição ou reversão da carcinogênese, um processo que começa com células de morfologia normal e termina com a formação de tumores invasivos (KELLOF et al., 1994). Nas últimas duas décadas, um aumento nas evidências obtidas a partir de estudos epidemiológicos e de laboratório, tem demonstrado que algumas plantas, como um todo ou através de compostos isolados, têm efeitos protetores substanciais na carcinogênese humana (SURH; FERGUSON, 2003).

Embora muitos remédios de origem vegetal tenham sido relatados como anticarcinogênicos, somente poucos têm ganhado substancial popularidade como terapias alternativas para a doença. Terapias complementares ou adjuvantes, como os próprios nomes sugerem, são tipicamente usadas para suplementar a medicina ou prover a atenuação dos efeitos adversos através de tratamentos não invasivos, com pouco ou nenhum efeito adverso (CASSILETH, 1996).

O presente estudo teve como objetivo avaliar a atividade anticlastogênica de extratos vegetais de quatro espécies de plantas medicinais do cerrado brasileiro, pertencentes ao gênero *Miconia*: *M. albicans*, *M. cabucu*, *M. rubiginosa*, *M. stenostachya*. Todos os extratos foram anteriormente avaliados *in vivo* por nosso grupo nas concentrações de 200, 400 e 540 mg/Kg p.c. e nenhum deles apresentou mutagenicidade em nenhuma das concentrações testadas (trabalho submetido). A partir desses resultados, a maior concentração de cada extrato foi escolhida para ser avaliada quanto à sua capacidade de reduzir danos no DNA causados pelo quimioterápico ciclofosfamida, através do teste do micronúcleo em células da medula óssea de camundongos.

2. Materiais e Métodos

2.1 Animais

Foram utilizados camundongos Swiss albinos (*Mus musculus*), com aproximadamente 30 g de peso corpóreo ao início dos tratamentos, provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual de Londrina (Paraná – Brasil), mantidos individualmente em caixas de polietileno com tampa grade, de acordo com as recomendações do *Canadian Council on Animal Care* (OLFERT et al., 1993). Esse projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Estadual Paulista (Unesp- Araraquara) de acordo com o protocolo número 50-2004.

2.2 Extratos Vegetais

As partes aéreas de *Miconia cabucu* Hoehne foram coletadas em abril de 2005 em Pariquera-Açu, estado de São Paulo, Brasil, e identificadas por Prof. Dr. Jorge Yoshio Tamashiro do Instituto de Biologia, Unicamp, São Paulo. A exsicata (no. 1430) foi depositada no herbário da Universidade Estadual de Campinas, Brasil.

Miconia rubiginosa (Bonpl.) (exsicata BOTU 25.376) e *Miconia stenostachya* D.C (exsicata BOTU 25.377) foram coletadas em março de 2005 em Palmeiras da Serra, Pratânia, estado de São Paulo, Brasil e foram identificadas pelo Dr. Luiz Fernando Rolim de Almeida do Instituto de Botânica, UNESP. As exsicatas foram depositadas no herbário “Irina Delanova Gemtchujnicov” BOTU do Instituto de Biociências, UNESP, Botucatu.

Miconia albicans (Sw.) Steud foi coletada na Universidade Estadual de São Paulo (UNESP), campus de Bauru e identificada pela Dra. Anne L. Dokkedal. A exsicata foi depositada no herbário do Departamento de Biologia da UNESP/Bauru (UNBA), com o número ALD 145.

Os materiais vegetais foram secos em estufa a 40°C e moídos em moinho de facas. Os extratos foram preparados por maceração com CHCl₃ para extrair os componentes mais apolares e com MeOH para a extração dos constituintes polares. Posteriormente foram concentrados em evaporador rotativo à pressão reduzida. As massas obtidas estão relatadas na Tabela 1. A extração de cada solvente foi realizada três vezes, a fim de se obter um bom rendimento.

→ Tabela 1

O *clean up* por SPE-C₁₈ foi realizado de acordo com o procedimento descrito na Figura 1. Essa metodologia foi desenvolvida a fim de se obter frações enriquecidas de metabólitos da mesma classe. As frações obtidas foram analisadas separadamente por HPLC-UV-DAD e a análise dos espectros de UV obtidos sugere a presença de derivados de ácidos fenólicos de alta polaridade, taninos, flavonóides glicosilados e catequinas (RODRIGUES et al, 2007).

→ Figura 1

2.3 Ciclofosfamida (CPA)

A CPA (C₂H₁₅Cl₂N₂P.H₂O) é um agente antineoplásico e imunossupressor altamente mutagênico, utilizado em tratamentos quimioterápicos. Caracteriza-se por ser um pó cristalino, fino, branco, com pouco ou nenhum odor, e possui peso molecular de 279,1 (ANDERSON et al., 1995).

CPA (Sigma- 6055-19-2) foi utilizada como controle-positivo na dose de 40 mg/kg p.c., sendo diluída em água destilada e administrada via intraperitoneal.

2.4 Tratamento dos animais

Os animais foram distribuídos em grupos de 10 (5 machos e 5 fêmeas) para cada tratamento e receberam 0,1 mL de cada uma das soluções empregadas para cada 10 g de peso corpóreo, além de água e alimento *ad libitum* no decorrer de todo o período de tratamento.

Os extratos foram avaliados na concentração de 540 mg/Kg p.c, escolhida com base nos estudos prévios de mutagenicidade. Para isso, foi realizado um tratamento simultâneo do extrato com o agente indutor de danos, a ciclofosfamida (na dose de 40 mg/Kg p.c). Esta foi administrada em dose única, via intraperitoneal, uma hora depois do extrato vegetal, água destilada (controle negativo) ou solvente serem administrados via *gavage*. Com essa diferença de uma hora entre os tratamentos espera-se ter ocorrido a entrada simultânea da CPA e dos componentes do extrato, da água e do solvente na corrente sanguínea dos animais, uma vez que os compostos (com exceção da CPA) estarão sujeitos ao trânsito digestivo. Para avaliação dos efeitos protetores dos extratos de *Miconia* contra os danos clastogênicos promovidos pela CPA os animais foram divididos nos seguintes grupos:

1. Água destilada *via gavage*
2. Tween 8% *via gavage*
3. CPA *via intraperitoneal*
4. CPA + Tween 8% *via gavage*
5. CPA + EMeOH de *M. albicans*
6. CPA + ECHCl₃ de *M. albicans*
7. CPA + EMeOH de *M. cabucu*
8. CPA + EMeOH de *M. rubiginosa*
9. CPA + EMeOH de *M. stenostachya*

Todos os animais tratados sofreram eutanásia 30 horas após os tratamentos, por deslocamento cervical.

2.5 Análise do material obtido da medula óssea

2.5.1 Teste do Micronúcleo em Células da Medula Óssea de Camundongos

A técnica utilizada para o estudo de micronúcleos em células de medula óssea foi a descrita por Schmid (1975). Após a morte dos animais, os fêmures foram retirados e as epífises distais cortadas. Com uma seringa contendo 1ml de soro bovino fetal (Gibco), a medula óssea foi retirada e depositada num tubo de centrífuga contendo também 1mL desse soro. O material foi, então, homogeneizado com pipeta Pasteur e, em seguida, os tubos contendo as células da medula óssea foram centrifugados a 800rpm por 10 minutos e o sobrenadante descartado. O *pellet* foi ressuspensionado no restante do sobrenadante (cerca de 0,3 mL). Em lâminas de vidro limpas e secas, com o auxílio de lamínula de vidro, foram realizados esfregaços com uma gota de solução das células obtidas. As lâminas foram fixadas 24 horas após a realização dos esfregaços com metanol absoluto por 10 minutos. A coloração foi realizada 24 horas após a fixação das células, com Giemsa 5% diluído em tampão fosfato. As lâminas secaram ao ar e, então, foram armazenadas em geladeira até a análise citológica.

Foram analisados 2000 eritrócitos policromáticos (PCEs) por animal para verificação da frequência de células micronucleadas nos diferentes tratamentos efetuados. A análise foi realizada em microscópio binocular de luz comum (Nikon), com objetiva de 100x (imersão) em teste cego, de acordo com os critérios utilizados para análise de micronúcleos previamente descritos por Titenko-Holland et al. (1997) e Huber et al. (1983).

2.5.2 Teste de Citotoxicidade

A determinação da citotoxicidade dos compostos-testes na medula óssea foi feita por meio da porcentagem de eritrócitos policromáticos (PCE) em relação ao total de eritrócitos (PCE + NCE) onde NCE são eritrócitos normocromáticos (RIBEIRO, 2003). As lâminas foram as mesmas utilizadas na análise do micronúcleo em células da medula óssea.

2.6 Porcentagem de Redução de Danos

A porcentagem de redução de danos (diminuição da frequência média de células micronucleadas) dos extratos que mostraram atividade anticlastogênica foi calculada de acordo com Manoharan e Banerjee (1985) e Waters et al. (1990), usando a fórmula:

$$(\%) \text{ Redução} = \frac{\text{frequência de MNPCEs em A} - \text{frequência de MNPCEs em B}}{\text{frequência de MNPCEs em A} - \text{frequência de MNPCEs em C}} \times 100$$

onde “A” é o grupo de células tratadas com CPA (controle positivo); “B” é o grupo de células tratadas com os extratos associados à CPA e “C” o grupo controle negativo.

2.7 Análise Estatística

Para a análise estatística dos resultados foi empregado o teste de análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de Tukey, no qual foram comparadas entre si as médias de MNPCes e as relações PCE/NCE obtidas para cada grupo de tratamento.

3. Resultados

A Tabela 2 mostra as frequências de MNPCes observadas na medula óssea dos animais tratados com os extratos associados à CPA e também as relações PCE/NCE obtidas em cada grupo de tratamento, ambos resultados obtidos também para os grupos controle negativo (água destilada), controle positivo (CPA) e controle do solvente (Tween 8%).

→ Tabela 2

Pode-se observar que a frequência de células micronucleadas diminuiu apenas para os grupos tratados com extratos das espécies *Miconia rubiginosa* e *Miconia stenostachya*, sendo as porcentagens de redução de danos calculadas de, respectivamente, 52,35 e 31,03% (Tabela 2).

Não foi observada nenhuma diferença estatisticamente significativa entre as relações PCE/NCE obtidas em cada grupo de tratamento, mostrando que a associação dos extratos com a CPA não induziu citotoxicidade (Tabela 2).

4. Discussão

Recentemente, apesar de várias drogas clássicas derivadas de plantas terem perdido muito espaço para os fármacos de origem sintética, outras têm aparecido e recebido atenção especial e prestígio terapêutico, evidenciando que fármacos derivados de plantas e fitoterápicos têm o mesmo valor fármaco-econômico. Um indício do renascimento de fármacos derivados de fontes vegetais é a grande quantidade e progresso da pesquisa clínica, especialmente no campo dos agentes anticancerígenos, onde podem ser citados taxol, podofilotoxina e camptotecina, bem como dos compostos antimaláricos, como por exemplo a artemisinina (DE SMETT, 1997).

Ainda que exista uma ampla variedade de compostos ativos de origem natural que possam ser futuramente relacionados como medicamentos, os desafios estão centrados principalmente em métodos farmacológicos apropriados e ensaios biológicos que possam predizer uma certa eficácia clínica à substância em estudo (HOSTETTMAN et al., 1997).

A elucidação dos componentes ativos presentes nas plantas, bem como seus mecanismos de ação, vem sendo um dos maiores desafios para a química farmacêutica, bioquímica e a farmacologia. As plantas contêm inúmeros constituintes e seus extratos, quando testados, podem apresentar efeitos sinérgicos entre os diferentes princípios ativos devido à presença de compostos de classes ou estruturas diferentes contribuindo para a mesma atividade. No estudo da atividade biológica de extratos vegetais é importante a seleção de bioensaios para a detecção do efeito específico. Os sistemas de ensaio devem ser simples, sensíveis e reproduzíveis (GEBHARDT, 2000).

O teste do micronúcleo, capaz de detectar quebras ou perdas cromossômicas, encontra-se em grande destaque há muito tempo, dada a sua utilização em pesquisas de mutagênese e por tratar-se de um método que apresenta, entre outras vantagens, o fato de ser relativamente rápido e barato (SLESISKI; GUZZIE, 1988; ZALACAIN et al., 2005). O primeiro protocolo para o teste do micronúcleo em camundongos foi desenvolvido por Schmid (1975) usando células da medula óssea de roedores, onde os micronúcleos são contados em eritrócitos jovens, pois permanecem no citoplasma após a expulsão dos núcleos e são facilmente reconhecíveis devido às suas formas arredondadas e coloração característica.

No presente estudo, a ciclofosfamida, droga empregada no tratamento de uma série de neoplasias, artrites reumatóides e também usada como imunossupressora em casos de transplantes de órgãos, foi utilizada como controle-positivo. Em células somáticas, a ciclofosfamida produz micronúcleos em ratos, camundongos e hamsters chineses, principalmente por quebras cromossômicas (ANDERSON et al., 1995). A CPA associada aos extratos de quatro plantas medicinais pertencentes ao gênero *Miconia* em camundongos e a observação das células da medula óssea após tratamento agudo indicaram que somente os extratos de *Miconia rubiginosa* e *Miconia stenostachya* diminuíram a frequência de células micronucleadas em relação ao controle positivo (CPA).

Efeitos protetores mais consistentes foram observados por nosso grupo em células do sangue periférico de camundongos utilizando-se o teste do micronúcleo, pois todos os quatro extratos avaliados foram capazes de reduzir as frequências de células micronucleadas produzidas pela CPA (trabalho submetido). De acordo com o relato do “The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test” (1992), é difícil comparar precisamente as frequências dos eritrócitos jovens da medula óssea e do sangue periférico, porque as populações podem ser diferentes de acordo com o critério para a classificação de PCEs e RETs (reticulócitos). PCE jovem e NCE maduro são fáceis de classificar, mas células em transição de um estado para o outro são um desafio para o observador (PARTON et al., 1996). Em

RETs, é menos provável que ocorram problemas na análise porque a coloração por laranja de acridina permite uma classificação menos subjetiva e mais precisa.

A análise química dos extratos avaliados revelou, principalmente, a presença de flavonóides, taninos e outros compostos fenólicos e os dados disponíveis na literatura sobre as atividades biológicas destes compostos auxiliam na compreensão dos resultados obtidos. Segundo Ribeiro; Seravalli (2004), os flavonóides compõem uma ampla classe de substâncias de origem natural, englobando uma classe importante de pigmentos naturais encontrados com frequência na natureza, unicamente em vegetais. Entretanto, tais compostos possuem uma série de propriedades farmacológicas que os fazem atuarem sobre os sistemas biológicos (LOPES et al., 2003), por exemplo, como antioxidantes. A dieta mediterrânea, rica em frutas frescas e vegetais, tem sido associada com a baixa incidência de doenças cardiovasculares e câncer, principalmente devido à elevada proporção de compostos bioativos como vitaminas, flavonóides e polifenóis (BENAVENTE-GARCÍA et al., 1999). Em recente revisão, Neuhauser (2004), analisando mais de uma dezena de publicações, encontrou diminuição no risco de câncer de 40% a 58% entre as pessoas que mais ingeriam os alimentos que contêm flavonóides em comparação com as que menos ingeriam, após períodos que variaram de 13 a 30 anos de seguimento.

Os taninos podem ser encontrados abundantemente em raízes, galhos, folhas, flores, frutos e sementes das árvores. Ele constitui-se de carboidrato simples, goma hidroxicoloidais, fenóis e aminoácidos (MARTINEZ, 1996; DUTRA, 1997). Os taninos são descritos na literatura como compostos com atividades antimutagênica (DAUER et al., 2003), antioxidante (HASLAM, 1996), antitumoral (SALEEM et al., 2002), dentre outras.

Os compostos químicos isolados a partir dos extratos das quatro espécies avaliadas foram caracterizados quimicamente, porém, apenas de forma qualitativa. Diferenças quantitativas significativas entre os compostos poderiam justificar os efeitos protetores apresentados somente pelos extratos de *Miconia rubiginosa* e *Miconia stenostachya*. Sendo assim, sugere-se a realização de estudos para quantificação dos compostos isolados que possibilitem identificar quais os responsáveis pelos efeitos protetores observados. Esses extratos poderão ser promissores na busca por compostos adjuvantes aos tratamentos quimioterápicos, uma vez que poderiam atuar nas células sadias diminuindo os efeitos adversos do tratamento do câncer.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo suporte financeiro do Programa BIOTA- Fapesp e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES/DS) pela bolsa cedida à J.M Serpeloni e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelas bolsas produtividade concedidas aos Drs. W. Vilegas e E.A.Varanda.

Referências

ANDERSON, D. et al. Cyclophosphamide: review of its mutagenicity for an assessment of potential germ cell risks. *Mutation Research*, v. 330, p. 115-181, 1995.

ARIAS, T. D. *Glosario de medicamentos: desarrollo, evaluación y uso*. Washington: Organización Panamericana de La Salud/Organización Mundial de La Salud, 1999.

BENAVENTE-GARCIA, O. et al. Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea* L. leaves. *Food Chemistry*, v. 68, p. 457-462, 1999.

CALIXTO, J. B. *Plantas medicinais sob a ótica da química moderna*. 1ª.ed. Chapecó: Argos - Editora Universitária, 2001. 77p.

CASSILETH, B. R. Alternative and complementary cancer treatments. *The oncologist*, v. 1, p. 173-179, 1996.

DAUER, A. et al. Genotoxic and antigenotoxic effects of catechin and tannins from the bark of *Hamamelis virginiana* L. in metabolically competent, human hepatoma cells (HEP G2) using single cell gel electrophoresis. *Phytochemistry*, v. 63, p. 199-207, 2003.

DE SMET, P. A. G. M. The role of plant-derived drugs and herbal medicines in healthcare. *Drugs*, v. 54, p. 801-840, 1997.

DUTRA, C. Avaliação do potencial de actinomicetos no trabalho de efluentes de indústrias que processam madeira. 1997. Tese de Mestrado - UFRJ, Rio de Janeiro.

GEBHARDT, R. *In vitro* screening of plant extracts and phytopharmaceuticals: novel approaches for the elucidation of active compounds and their mechanisms. *Planta Medica*, v. 66, p. 99-105, 2000.

HASLAN, E. Natural polyphenols (vegetal tannins) as drug: Possible modes of action. *Journal of Natural Products*, v. 59, p. 205-215, 1996.

HOSTETTMAN, K.; MARSTON, A.; HOSTETTMAN, M. *Preparative chromatography techniques*. New York: Verlag Berlin Heidelberg, 1997.

HUBER, R et al. The suitability of the human lymphocyte micronucleus assay system for biological dosimetry. *Mutation Research*, v. 111, p. 185-193, 1983.

KELLOFF, G. J. et al. Progress in cancer chemoprevention. Perspectives on agent selection and short-term clinical intervention trials. *Cancer research (suppl)*, v. 54, p. 2015-2024, 1994.

LOPES, R. M., et al. *Flavonóides*. Biotecnologia: Ciência & Desenvolvimento, 2003. p. 18-22.

MANOHARAN, K.; BANERJEE, M R. β -Carotene reduces sister chromatid exchange induced by chemical carcinogens in mouse mammary cells in organ culture. *Cell Biology International Reports*, v. 9, p. 783-789, 1985.

MARTINEZ, F. L. *Taninos Vegetais e suas aplicações*. Universidade de Havana/Cuba. Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 1996.

NEUHÖAUSER, H.L. Dietary flavonoids and cancer risk; evidence from human population studies. *Nutrition and Cancer*, v. 50, p. 1-7, 2004.

OLFERT, E. D. et al. *The guide to the care and use of experimental animals*. Vol 1. Canadá: Canadian Council on Animal Care, 1993.

OMS/ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. Pautas para la evaluación de Medicamentos Herbarios. Ginebra, 1991.

PARTON, J.W.; HOFFMAN, W.P.; GARRIOTT, M.L. Validation of an automated image analysis micronucleus scoring system. *Mutation Research*, v. 370, p. 65-73, 1996.

RIBEIRO, E. P.; SERAVALLI, E. A. G. *Química de alimentos*. São Paulo: Editora Edgard Blucher: Instituto Mauá de Tecnologia, 2004.

RIBEIRO, L. R. Teste do micronúcleo em medula óssea *in vivo* In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. *Mutagênese Ambiental*. Canoas: Ed. Ulbra, 2003. p. 173-200.

RODRIGUES, J. et al. An unusual C₆-C_{6'} linked flavonoid of *Miconia cabucu* (Melastomataceae). *Phytochemistry*, v. 68, p. 1781-1784, 2007.

SALEEM, A. et al. Inhibition of cancer cell growth by crude extract and the phenolics of *Terminalia chebula* Retz. fruit. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 81, p. 327-336, 2002.

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

SLESISKI, R. S; GUZZIE, P. J. Review of Recent Advances in the Development and Application of the Micronucleus Test System. In: BALLANTYNE, B. *Perspectives in basic and applied toxicology*. Wright, 1988. p. 161-176.

SURH, Y.; FERGUSON, L. R. Dietary and medicinal antimutagens and anticarcinogens: molecular mechanisms and chemopreventive potential – highlights of a symposium. *Mutation research*, v. 524, p. 1-8, 2003.

THE COLLABORATIVE STUDY GROUP FOR THE MICRONUCLEUS TEST. Micronucleus test with mouse peripheral blood erythrocytes by acridine orange supravital staining: The summary report of the 5th collaborative study by CSGMT/ JEMS – MMS. *Mutation Research*, v. 278, p. 83-98, 1992.

TITENKO-HOLLAND, N. et al. Genotoxicity of malathion in human lymphocytes assessed using the micronucleus assay *in vitro* and *in vivo*: a study of malathion-exposed workers. *Mutation Research*, v. 388 (1), p. 85-95, 1997.

VEIGA JR., V. F.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? *Química Nova*, v. 28, p. 519-528, 2005.

WATERS, M. D. et al. Antimutagenic profiles for some model compounds. *Mutation Research*, v. 238, p. 57-85, 1990.

ZALACAIN, M.; SIERRASESÚMAGA, L.; PATIÑO, A. El ensayo de micronúcleos como medida de inestabilidad genética inducida por agentes genotóxicos. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*, v. 28, p. 227-236, 2005.

Tabela 1: Quantidade de massa obtida após maceração das folhas das espécies estudadas

Espécies	Planta seca (g)	Extratos (% de rendimento)	
		CHCl ₃	MeOH
<i>M. albicans</i>	500	3.1	15.0
<i>M. cabucu</i>	600	ne	3.3
<i>M. rubigibnosa</i>	500	ne	9.3
<i>M. stenostachya</i>	500	ne	14.6

ne: não estudado.

Tabela 2: Número médio de MNPCEs em um total de 2000 células analisadas por animal por tratamento para a avaliação dos efeitos protetores de diferentes extratos de plantas do gênero *Miconia*.

TRATAMENTOS (mg/kg p.c.)	Nº Animais	MNPCEs	X ± DP/animal	%R	RAZÃO PCE/PCE+NCE X ± DP
Água Destilada	10	34	3,4 ± 1,27 ^a		0,586 ± 0,04
Tween 8%	10	27	2,7 ± 1,64 ^a		0,662 ± 0,06
CPA (40)	10	353	35,3 ± 5,91 ^b		0,656 ± 0,10
Tween 8% + CPA (40)	10	338	33,8 ± 2,86 ^b		0,641 ± 0,07
Extratos (540)+ CPA (40)					
<i>M. albicans</i> MeOH	10	348	34,8 ± 4,32 ^b		0,642 ± 0,07
<i>M. albicans</i> CHCl ₃	10	304	30,4 ± 4,62 ^b		0,603 ± 0,06
<i>M. cabucu</i> MeOH	10	344	34,4 ± 4,72 ^b		0,598 ± 0,06
<i>M. rubiginosa</i> MeOH	10	186	18,6 ± 1,96 ^c	52,30	0,610 ± 0,05
<i>M. stenostachya</i> MeOH	10	254	25,4 ± 3,53 ^c	31,03	0,540 ± 0,03

X ± DP: Média ± Desvio padrão; PCE: eritrócito policromático; NCE: eritrócito normocromático; MNPCE: eritrócito policromático micronucleado; MeOH: extrato metanólico; CHCl₃: Extrato clorofórmico; Cyclophosphamide (CPA): positive control; %R: Porcentagem de redução de danos
* Valores seguidos pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si

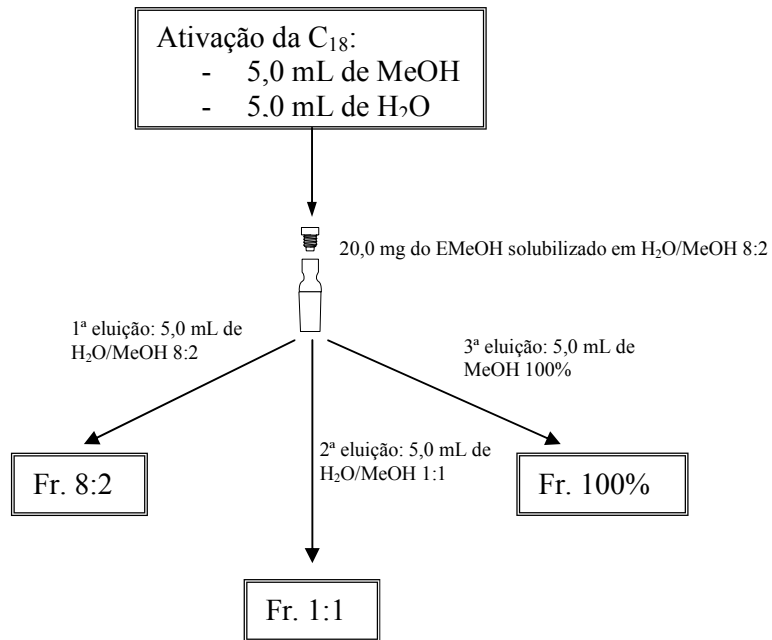
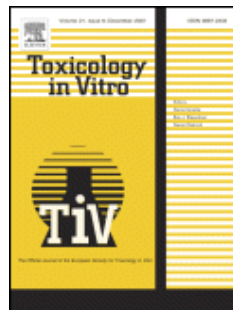


Figura 1: Etapas de preparação dos extratos para análise por HPLC-UV-DAD (Rodrigues et al., 2007).

4 EXPERIMENTOS *IN VITRO*

4.1 ARTIGO 4

Citotoxic and mutagenic evaluation of vegetal extracts from species belong to *Miconia* genus and their influence over the mutagenicity induced by doxorubicin: an *in vitro* analysis



Artigo a ser submetido à Revista *Toxicology in vitro*

ISSN: 0887-2333

Impact factor: 2.045

Cytotoxic and mutagenic evaluation of extracts from plant species belong to *Miconia* genus and their influence over the mutagenicity induced by doxorubicin: an *in vitro* analysis

Short running title: Antimutagenicity of extracts from *Miconia*

Juliana M. Serpeloni^{a*}, Mateus P. Mori^a, Karina Yanagui^a, Gustavo R.M. Barcelos^a, Wagner Vilegas^b, Eliana A. Varanda^c, Ilce M. S. Cólus^a

^a *Departamento de Biologia Geral, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brasil.*

^b *Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, SP, Brasil.*

^c *Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Ciências, Universidade Estadual Paulista, Bauru, SP, Brasil.*

* Corresponding author:

Tel: +55 43-33714191 Fax: +55 43-33714527

E-mail address: julianaserpeloni@yahoo.com.br

Abstract

Miconia is a genus occurring in tropical America and its extracts and isolated compounds have demonstrated antibiotic, antitumoral, analgesic and antimalarial activities. The objective of the present work was to assess the cytotoxicity, mutagenicity and antimutagenicity of *Miconia* methanolic extracts on Chinese hamster lung fibroblasts cell cultures (V79). The three concentrations evaluated in the mutagenicity and antimutagenicity tests (5, 10 and 20 µg/mL) were chosen through clonogenic assay. The cultures were treated with different concentrations of the extracts (mutagenicity test) or with the extract associated with doxorubicin (DXR) at 1 µg/mL (antimutagenicity test) in three protocols: pre, simultaneous and post treatment. Apart from these treatments, the cell cultures were also treated with distilled water (negative-control) and DXR (positive-control). The data obtained in micronucleus (MN) test showed a significant reduction in MN frequency in the cultures treated with DXR and extracts in comparison with those that received only DXR, as well as the absence of mutagenicity in all the treatments realized. This work reinforces the therapeutic properties previously described to *Miconia* species and indicates the safe use of these extracts in the concentrations utilized.

Keywords: Micronucleus test. *Miconia*. Mutagenicity. Antimutagenicity. Clonogenic assay.

1. Introduction

Plants have formed the basis of sophisticated traditional medicine systems that have been in existence for thousands years and continue to provide mankind with new medicines (Gurib-Fakim, 2006). Nearly two decades ago it was done an analysis of the data on prescriptions dispensed from community pharmacies in the US from 1959 to 1980. This analysis indicated that 25% of the prescriptions contained plant extracts or active principles derived from higher plants and at least 119 chemical substances, derived from 90 plant species, could be considered as important drugs in use in one or more countries (Farnsworth et al., 1985).

Bioassay is a very crucial stage in assessing the pharmacological actions of plant extracts and their ethnomedical uses. In the initial stages, *in vitro* testing has priority over *in vivo* studies involving laboratory animal models. This decision is usually based on scientific, economic and ethical grounds (Gurib-Fakim, 2006).

The *in vitro* micronucleus assay is a mutagenicity test system used for the detection of chemicals that induce the formation of small membrane-bound DNA fragments such as micronuclei in the cytoplasm of interphase cells (Kirsch-Volders, 1997). This assay has the potential to detect the activity of both, clastogenic and aneugenic chemicals (Parry and Sorrs, 1993).

According to OEDC (Organization for Economic Co-operation and Development) guideline for the testing chemicals using *in vitro* micronucleus test (2004), at least three analyzable test concentrations should be used and these concentrations should be chosen with care using data from preliminary cytotoxicity studies. In 1956, Puck and Marcus published a seminal paper describing a cell culture technique for assessment of the clone or colony forming ability of single mammalian cells plated in culture dishes with a suitable medium. This clonogenic assay has been used in the ensuing decades and detect all cells that have retained the capacity for producing a large number of progeny after treatments that can cause cell reproductive death as a result of damage to chromosomes, apoptosis among others (Brown and Attardi, 2005). Clonogenic assay have yielded information about differences in sensitivity to chemotherapeutic agents among tumors and normal tissues and about modification of treatment effectiveness by various conditions and modes of application (Franken et al., 2006).

Miconia is a genus of approximately 1000 species occurring in tropical America and belonging to the family Melastomataceae, which is pan tropical, with over 166 genera that include about 4300 species (Renner, 1993). *Miconia* extracts and isolated compounds have demonstrated antibiotic, antitumoral, analgesic and antimalarial activities (Hasrat, 1997; Cunha et al., 2003). Due to the fact of many of these plants are used as medicine by people living in the Savannah area, the aim of the present study was assess the mutagenic potential of extracts from these four *Miconia* species and also the possible protective effects of them against the damage induced on DNA by doxorubicin and to contribute with the knowledge of the biological activities of these species.

2. Materials and methods

2.1 Cell line and culture conditions

Chinese hamster lung fibroblasts (V79) were kindly provided by Prof. Dr. Sakamoto-Hojo (F.F.C.L. – Ribeirão Preto/USP). Cells were grown at 37° C in 10 mL DMEM/Ham-F-10 (1:1) medium (Sigma) supplemented with 10% fetal calf serum (Gibco), antibiotics

(penicillin 0.06 g/L and streptomycin 0.12 g/L – Sigma) and HEPES (2.38 g/L – Sigma) in 25 cm² culture flasks (Nunc) at 37° C in a B.O.D. incubator (Fanem).

2.2 *Vegetal extracts*

Aerials parts of *Miconia cabucu* Hoehne were collected in April of 2005 at Pariquera-Açu, São Paulo State, Brazil. The plants were authenticated by Dr. Jorge Y. Tamashiro. A voucher specimen (HUEC 1430) was deposited at the Herbarium of the Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), SP, Brazil.

Miconia rubiginosa (Bonpl.) (voucher BOTU 25.376) and *M. stenostachya* Schrank & Mart (voucher BOTU 25.377) were collected in March of 2005 at Palmeiras da Serra, Pratânia, São Paulo State, Brazil and authenticated by Luiz F.R. Almeida. Voucher specimens were deposited at the Herbarium “Irina Delanova Gemtchujnicov” BOTU of the Instituto de Biociências, UNESP, Botucatu, SP, Brazil.

Miconia albicans (Sw.) Steud were collected in March of 2005 in Universidade Estadual Paulista (UNESP), campus of Bauru (São Paulo, Brazil) and identified by Dra. Anne L. Dokkedal. A voucher specimen is deposited in the Herbarium of Departamento de Biologia of UNESP/Bauru under number ALD 145.

The aerial parts were dried (at 40 °C, for 4 days) and powdered. The powdered dried material was macerated with 2 L of chloroform, methanol and 70% methanol, successively at room temperature (3 times and for 48 hour for each solvent). The chemical constituents present in the extracts of the species studied were identified according to the method of Wagner et al. (1984).

2.3 *Doxorubicin (DXR)*

Chemotherapeutic DXR is an anthracycline type antibiotic and is highly effective against a wide variety of cancers, as it is capable of generating breaks in DNA strands and countless free radical species, promoting DNA adducts and blocking the replication of genetic material (Quiles et al., 2002).

In the present study, the DXR (Adriblastina® RD – Pharmacia & Upjohn, Milan Italy, (CAS no. 25316-40-9) was dissolved in distilled water in a final concentration of 1µg/mL of culture medium and it was protected from light.

2.4 Clonogenic assay

In the experiments of cell viability, the cell lineage was treated with the concentrations of 5, 10, 20, 30, 40, 60, 80 and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of the four vegetal extracts besides the positive (DXR) and negative (distillated water) controls. The cultures were treated for two hours and afterwards trypsinized and 300 cells were seeded per flask of cultivation (3 flasks per concentration). The experiments were run 7 days, and the flasks were observed daily with a microscope of inverted objective. The culture medium was then removed, the cellular colonies were washed with cold PBS and stained with Giemsa (1:20 phosphate buffer, pH 7.0) during 10 minutes. The colonies were counted with the assistance of a magnifying glass.

2.5 Treatments

Three totally independent experiments were performed to determine the mutagenicity and antimutagenicity of the different concentrations of four *Miconia* methanolic extracts. Positive (DXR) and negative (distillated water) control groups were also included in the analysis. All experiments were carried out (in triplicate) using V79 cells between the 3rd and 8th culture passage after thawing. For the experiments, 10^6 cells were seeded into tissue-culture flasks, incubated for two cycles (24 h) in complete D-MEM/Ham-F-10 medium, washed with PBS and then submitted to one of the following treatments in serum-free medium: a) distillated water for 2 h (negative control); b) DXR for 2 h (positive control); c) *Miconia* extracts (5; 10 and 20 mg/mL) (extract treatment) for 2 h; d) extract plus DXR for 2 h (simultaneous-treatment); e) *Miconia* extracts (5; 10 and 20 mg/mL) for 2 h before washing the cells and adding DXR for 2 h (pre-treatment with extracts); f) DXR for 2 h before washing the cells and adding *Miconia* extracts (5; 10 and 20 mg/mL) for 2 h (post-treatment with extracts). All cell cultures were subjected to treatment with cytochalasin (3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of culture medium) for 15 hours before the harvest. Treatment “c” was the mutagenicity experiment and treatments “d”, “e” and “f” were the antimutagenicity experiments.

2.6 Micronucleus test

At the harvesting time, the cells were rinsed twice with 5 mL PBS, trypsinized and centrifuged for 5 min at 900 rpm. The pellet was resuspended in ice-cold hypotonic solution (1% sodium citrate), plus one drop of 10% formaldehyde, and then carefully homogenized with a Pasteur pipette. This cell suspension was centrifuged under the same conditions and the pellet resuspended in methanol/acetic acid 3:1, and again homogenized with a Pasteur pipette.

Fixed cells were then dropped onto previously cleaned slides and covered with a film of ice-cold distilled water. They were stained in 5% Giemsa dissolved in phosphate buffer (Na_2HPO_4 0.06 M and KH_2PO_4 0.06 M – pH 6.8) for 5 min, washed with water, dried and kept at 4°C until the realization of microscope analysis.

2.7 Scoring procedures

One thousand binucleated cells with well preserved cytoplasm were scored for coded slides in each experimental repetition using a Nikon microscope at 400× magnification, which resulted in the analysis of 3000 cells per treatment. The criteria for the identification of binucleated cells and micronuclei were as follows: (a) both the nuclei and micronuclei should be round; (b) the micronuclei should be smaller than 1/3 of the main nuclei; (c) the micronuclei must not touch the main nuclei; (d) the micronuclei must be the same color and intensity as the main nuclei (Huber et al., 1983 and Titenko-Holland et al., 1997).

The *Miconia* methanolic extracts capacity of reducing damage caused by the DXR was calculated according to Manoharan and Banerjee (1985) and Waters et al. (1990) using the formula:

$$\%R = \frac{A - B}{A - C} \times 100$$

on which %R is the reduction percentage, *A* the MN frequency after treatment with DXR, *B* the MN frequency after treatment with *Miconia* extract and DXR, and *C* is the MN frequency after treatment with distilled water.

NDI was calculated according to the method of Eastmond and Tucker (1989). Score 500 viable cells to determine the frequency of cells with 1, 2, 3 or 4 nuclei, and calculate the NDI using the formula:

$$\text{NDI} = (M_1 + 2M_2 + 3M_3 + 4M_4)/N,$$

Where, M_1 – M_4 represent the number of cells with 1–4 nuclei and *N* is the total number of viable cells scored (excluding necrotic and apoptotic cells).

2.8 Statistical analysis

The means for the clonogenic assay were calculated from three independent experiments. The ANOVA test ($p < 0.05$) followed by the Dunett test were used to compare the averages of each treatment with the negative control.

The mean micronucleated binucleated cells (MNBNCs) and their respective NDI were calculated from three independent experiments for each treatment. The ANOVA ($p < 0.05$) test

followed by the Tukey test were used for comparing the means with each other to assess the mutagenicity and antimutagenicity effects of the extracts.

3. Results

3.1 Clonogenic assay

The clonogenic assay was used to obtain a dose-dependent cell survival curve of when exposed to different concentrations of the methanolic extracts of different *Miconia* species. Results from the ANOVA and the Dunnett test, showed no significant differences between the cultures treated with extracts of *M. albicans*, *M. cabucu*, *M. rubiginosa* and *M. stenostachya* at the concentrations of 5, 10 and 20 µg/mL and the positive (DXR) and negative (distilled water) controls. Therefore, these concentrations presented no cytotoxic effect ($p < 0.05$). In contrast, the cultures exposed to extract of *M. albicans* up the concentration of 30 µg/mL, *M. cabucu* up the 40 µg/mL, *M. albicans* up to 40 µg/mL and *M. stenostachya* up to 60 µg/mL did exhibit significant differences when compared to the negative control (distilled water), presenting a toxic effect on the cells ($p < 0.05$). Thus, methanolic extracts of *Miconia* at the concentrations of 5, 10 and 20 µg/mL were chosen for the mutagenic and antimutagenic evaluations (Figures 1, a-d).

→ Figure 1

3.2 Micronucleus Test

The mean MN frequencies observed after using concentrations of 5, 10 and 20 µg/mL of *Miconia* extracts in *in vitro* V79 cell cultures were statistically similar to those obtained in the negative control group (distillated water); i.e., they presented no mutagenic effect (Table 1).

All concentrations of *Miconia* extracts in pretreatment, simultaneous and post-treatment in relation to DXR presented antimutagenic effect, since the mean MN frequencies were statistically different from those obtained in the positive control group (DXR) (Table 2).

The reduction percentages (%R) in micronucleus test after treatments with different extracts of *Miconia* species were calculated and are presented in Table 2. The reduction of micronucleated cells was more evident (77.2% to 94.1%) in post-treatment groups and less expressive (56.0 % to 70.6%) for simultaneous treatment groups.

3.3. NDI analysis

Tables 1 and 2 show the NDI for mutagenicity and antimutagenicity tests. Statistical analysis did not show differences between treatment groups and their respective negative control group.

→ Tables 1 and 2

4. Discussion

Toxicity of medicinal plants may be related to the mixtures of active compounds that they contain, their interactions with other herbs and drugs, contaminants or adulterants, or their inherent toxicity. Plants have complex mixtures of terpenes, alkaloids, saponins and other chemicals, increasing the risk of adverse reactions to any one of them or to the additive or synergistic effects of chemical interactions (Carson and Riley, 1995). The main constituents isolated from methanolic extracts of *Miconia* species evaluated in this study were flavonoids, tannins and phenolic compounds.

In our study the clonogenic assay was performed to determine the cell survival curve of the cultures treated with the four *Miconia* extracts evaluated (*M. albicans*, *M. cabucu*, *M. rubiginosa*, *M. stenostachya*). These extracts showed different levels of cytotoxicity and, as suggest by literature, the three lower doses not cytotoxic (5, 10 and 20 µg/mL) were chosen to be tested in the evaluation of mutagenicity and antimutagenicity.

None of the concentrations tested for all extracts showed elevation in MNBNCs compared to negative control. Therefore, the negative results obtained in the *in vitro* mutagenicity evaluation of *Miconia* extracts suggest that the compounds present in *Miconia* extracts do not cause chromosome damage and their interaction not result in mutagenicity. The NDI is useful parameter for comparing the mitogenic response and cytostatic effects of agents examined in the micronucleus assay (Fenech, 2000). In our study, this analysis also did not show alterations between treatment and negative control group showing that the extracts do not interfere in the kinetic of cell cycle.

The V79 cell line has been widely used to study the toxicity, mutagenicity and repair caused by a wide variety of DNA damaging agents. It presents no active metabolizing system, thus it is unable to activate and/or detoxify the mutagenic agent (Preston et al., 1981). Then, when this cell type was used to evaluate the mutagenicity and antimutagenicity, the compound utilized like positive control, i.e. doxorubicin, should be able to induce, among others, direct damage on DNA.

Despite extensive and long-standing clinical utilization, the mechanisms responsible for the antiproliferative and cytotoxic effects of the anthracycline antibiotic doxorubicin (DXR) are still uncertain and have been the subject of considerable controversy (Gewirtz, 1999). Proposed mechanisms are: intercalation into DNA (Ferguson and Baguley, 1996; Fornari et al., 1996); initiation of DNA damage via inhibition of topoisomerase II (Ramachandran et al., 1993; Ferguson and Baguley, 1996); DNA binding and alkylation (Cullinane et al., 1994); DNA cross-linking (Skladanowski and Konopa, 1994a,b); interference with DNA unwinding or DNA strand separation and helicase activity (Tuteja et al., 1997; Bachur et al., 1998); free radical formation (Sinha, 1989) with consequent DNA damage and/or lipid peroxidation; direct membrane effects (Vichi and Tritton, 1992).

Miconia methanolic extracts associated with DXR led to a reduction in the mean MNBNCs frequency in the cultures treated with all concentrations of all assessed extracts in the three protocols of treatment (pre, simultaneous and post treatment). In simultaneous treatments, effective antimutagenic agents are capable of act preventing the DNA damage, denominated desmutagenic properties. Such agents can also increase the fidelity of DNA replication and activate certain repair enzymes, after the DNA damage, in this case they are denominated bioantimutagenic (Kada et al., 1982; Kuroda et al., 1992).

The evaluation of the different protocols and the damage decrease percentages observed suggest that *Miconia* extracts have both desmutagenic and bioantimutagenic activity. According to the De Flora and Ferguson (2005), the reduction on the mean MNBNCs may be, among other things, due to the ability of extract components of: (i) inhibit the uptake of DXR; (ii) joining with DXR outside or inside the cells preventing its action on DNA; (iii) increase the maintenance of DNA structure and modulation of DNA metabolism and repair.

The literature reveals that plants can contain a large diversity of natural antioxidants that might serve as leads for the development of new drugs. The additive and synergistic effects of phytochemicals in fruit and vegetables also have been proposed as being responsible for their potent antioxidant and anticancer activities (Liu, 2004). Among the compounds detected in the *Miconia* methanolic extracts are tannins, phenolic acids and flavonoids that have been described as antimutagenic agents when assessed separately (Huang et al., 1985; Wiseman et al., 1997; Belicová et al., 2001; Kaur et al., 2000). Their interactions and possible synergistic effects may have facilitated the protective effects observed against the damage induced by DXR.

Flavonoids are polyphenols and their antiradical properties are directed towards highly reactive oxygen species (ROS) implicated in the initiation of lipid peroxidation; moreover,

flavonoids are soluble chain-breaking inhibitors of the peroxidation process, scavenging intermediate peroxy and alkoxy radicals and chelating metal ions which are of major importance for the initiation of radical reactions (Jovanovic et al, 1998). Other mechanisms include interference with the metabolite activation of promutagen, as blocking agents and formation of adducts with ultimate mutagens, modulators of DNA repair and inhibitors of tumor cell growth (Galati and O'Brien, 2004; Lee et al. 2003).

Tannins are one such class of compounds possessing protective properties (Huang et al., 1985; Mukhtar et al., 1988; Shimoi et al., 1985). Wang et al. (2006) showed that tannins isolated from *Balanophora polyandra* Griff. (Balanophoraceae) exhibited high activity of scavenging of free radicals, an important mechanism involved in reducing the frequency of mutations. Souza et al. (2007) also showed antiinflammatory and antiulcerogenic properties of tannins from *Myracrodruon urundeuva* Allemao (Anacardiaceae) in rodents, partly due to its antioxidant action.

Flavonoids and tannins may be responsible for the desmutagenic effect observed i.e. through their free radical scavenging activity. However, it is necessary to note that efficacy and mechanism of action of the extracts are not subject to variation when compared the four extracts. The post treatment was more effective for four species, emphasizing the effect bioantimutagenic of them increasing the maintenance of DNA structure and modulation of DNA metabolism and repair. According Ferguson (1990), modulation of DNA repair process can have profound effects on mutagenesis and related outcomes, at least in experimental systems.

In a work previously realized by our group (Barcelos et al., 2007), methyl methanesulfonate (MMS) was used as a damage-inducing agent in V79 cells and showed that methanolic extract of cashew, also rich in phenolic compounds like *Miconia* extracts, reduced the primary damage caused by MMS. These results are corroborated by our, using the same cell type and DXR like damage inducer, and strengthen the antimutagenic power of these compounds.

The presence of these many molecules in plants may be advantageous, as some of them may counteract the toxicity of others, and as a result, the net effect may be beneficial for therapeutic purposes (Venkatesh et al., 2007). The results obtained in this study indicate that *Miconia* extracts can be useful in the development of therapies aiming prevention of damage against DXR or other compounds that have the same mechanism of action. In a work previously realized by our group (unpublished data) the same extracts reduced the MN frequency in mice treated with cyclophosphamide, what encourages future studies with other

concentrations and with isolated compounds to clearer understanding of the properties attributed to *Miconia* genus.

Acknowledgements

The authors would like to thank the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) for the financial support of the Biota-Fapesp Program; the Conselho Nacional para o Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for grant to Vilegas, W. and Varanda, E.A; the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES/DS) for fellowship to Serpeloni, J.M. and Barcelos, G.R.M.

References

- Bachur, N.R., Lun, L., Sun, P.M., Trubey, C.M., Elliott, E.E., Egorin, M.J., Malkas, L., Hickey, R., 1998. Anthracycline antibiotic blockade of SV40 T antigen helicase action. *Biochemical Pharmacology* 55, 1025-1034.
- Barcelos, G.R.M., Shimabukuro, F., Maciel, M.A.M., Cólus, I.M.S., 2007. Genotoxicity and antigenotoxicity of cashew (*Anacardium occidentale* L.) in V79 cells. *Toxicology in Vitro* 21, 1468-1475.
- Belicová, A., Križková, L., Nagy, M., Krajčovič, J., Ebringer, L., 2001. Phenolic acids reduce the genotoxicity of acridine orange and ofloxacin in *Salmonella typhimurium* TA 102. *Folia Microbiologica* 47, 511-514.
- Brown, J.M., Attardi, L.D., 2005. The role of apoptosis in cancer development and treatment response. *Nature Reviews Cancer* 5, 231-237.
- Carson, C.F., Riley, T.V., 1995. Toxicity of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* or tea tree oil. *Journal of Toxicology: Clinical Toxicology* 33, 193-194.
- Cullinane, C., Cutts, S.M., Van Rosmalen, A., Phillips, D.R., 1994. Formation of adriamycin-DNA adducts *in vitro*. *Nucleic Acids Research* 22, 2296-2303.

Cunha, W.R., Martins, C., Ferreira, D.S., Crotti, A.E.M., Lopes, N.P., Albuquerque, S., 2003. *In vitro* trypanocidal activity of triterpenes from *Miconia* species. *Planta Medica* 69, 468-470.

De Flora, S., Ferguson, L.R., 2005. Overview of mechanisms of cancer chemopreventive agents. *Mutation Research* 591, 8-15.

Eastmond, D.A., Tucker, J.D., 1989. Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochores antibody. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 13, 34-43.

Farnsworth, N., Akerele, A.O., Bingel, A.S., Soejarto, D.D., Guo, Z., 1985. Medicinal plants in therapy. *Bulletin of the World Health Organization* 63, 965-981.

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

Ferguson, L.R., 1990. Mutagenic and recombinogenic consequences of DNA-repair inhibition during treatment with 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutation Research* 241, 369-377.

Ferguson, L.R., Baguley, B.C., 1996. Mutagenicity of anticancer drugs that inhibit topoisomerase enzymes. *Mutation Research* 355, 91-101.

Fornari, F.A., Jarvis, W.D., Grant, S., Orr, M.S., Randolph, J.K., White, F.K.H., Gewirtz, D.A., 1996. Growth arrest and non-apoptotic cell death associated with the suppression of c-myc expression in MCF-7 breast tumor cells following acute exposure to doxorubicin. *Biochemical Pharmacology* 51, 931-940.

Franken, N.A.P., Rodermond, H.M., Stap, J., Haveman, J., Van Bree, C., 2006. Clonogenic assay of cells *in vitro*. *Nature Publishing Group* 1 (5), 2315-2319.

Galati, G., O'Brien, P.J., 2004. Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: significance for their chemopreventive and anticancer properties. *Free Radical Biology Medicine* 37, 287-303.

Gewirtz, D.A., 1999. A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. *Biochemical Pharmacology* 57, 727–741.

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

Hasrat, J.A., De Backer, J.P., Valquelin, G., Vlietinck, A.J., 1997. Medicinal plants in Suriname: screening of plants extracts for receptobinding activity. *Phytomedicine* 4, 56-65.

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

Huber, R., Streng, S., Bauchinger, M., 1983. The suitability of the human lymphocyte micronucleus assay system for biological dosimetry. *Mutation Research* 111, 185-193.

Jovanovic, S.V., Streenken, S., Simic, M.G., Hara, Y., 1998. Antioxidant proprieties of flavonoids reduction potentials and electron transfer reactions of flavonoid radicals. In: *Flavonoids in health and disease*. New York, Marcel Dekker, 137-161.

Kada, T., Inoue, T., Namiki, N., 1982. Environmental desmutagens and antimutagens. In: Klekowski, E.J. (Ed.), *Environmental Mutagenesis and Plant Biology*. Praeger, New York, pp. 137–151.

Kang, K., Lee, H.J., Kim, C.Y., Lee, S. B., Tunsag, J., Batsuren, D., Nho, C.W., 2007. The Chemopreventive Effects of *Saussurea salicifolia* through Induction of Apoptosis and Phase II. Detoxification Enzyme. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 30(12), 2352-2359.

Kaur, S.J., Grover, I.S., Kumar, S., 2000. Modulatory effects of a tannin fraction isolated from *Terminalia arjuna* on the genotoxicity of mutagens in *Salmonella typhimurium*. *Food and Chemical Toxicology* 38, 1113-1119.

Kirsch-volders, M., 1997. Towards a validation of the micronuclei test. *Mutation Research* 392, 1-4.

Kuroda, Y., Jain, K.A., Tezuka, H., Kada, T., 1992. Animutagenicity in cultured mammalian cells. *Mutation Research* 267, 201-209.

Lee, J.C., Kim, J., Park, J.K., Chung, G.H., Jang, Y.S., 2003. The antioxidant, rather than pro-oxidant, activities of quercetin on normal cells: quercetin protects mouse thymocytes from glucose oxidase-mediated apoptosis. *Experimental Cell Research* 291, 386-397.

Liu, R.H., 2004. Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. *Journal of Nutrition* 134, 3479-3485.

Manoharan, K., Banerjee, M.R., 1985. β -Carotene reduces sister chromatid exchange induced by chemical carcinogens in mouse mammary cells in organ culture. *Cell Biology International Reports* 9, 783-789.

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

OECD Guideline for the testing of chemicals draft proposal for a new guideline 487: *In vitro* Micronucleus Test. Draft Guideline, june 14, 2004. Available in: <http://www.oecd.org/dataoecd/60/28/32106288.pdf>. Access in: 12/08/2007 à 14:30.

Parry, J.M., Sorrs, A., 1993. The detection and assessment of the aneugenic potential of environmental chemicals: the European Community aneuploidy project. *Mutation Research* 287, 3-15.

Preston, R.J., Au, W., Bender, M.A., Brewen, J.G., Carrano, A.V., Heddle, J.A., McFee, A.F., Wolf, S., Wassom, J.S., 1981. Mammalian *in vivo* and *in vitro* cytogenetic assays: a report of the U.S. EPA's Gene-Tox Program. *Mutation Research* 87, 143-188.

Quiles, J.L., Huertas, J.R., Battino, M., Mataix, J., Ramirez-Tortosa, M.C., 2002. Antioxidant nutrients and adriamycin toxicity. *Toxicology* 180, 79-95.

Ramachandran, C., Samy, T.S.A., Huang, X.L., Yuan, Z.K., Krishan, A., 1993. Doxorubicin-induced DNA breaks, topoisomerase II activity and gene expression in human melanoma cells. *Biochemical Pharmacology* 45, 1367-1371.

Renner, S.S., 1993. Phylogeny and classification of the Melastomataceae and Memecylaceae. *Nordic Journal of Botany* 13, 519-540.

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

Sinha, B.K., 1989. Free radicals in anticancer drug pharmacology. *Chemico-biological Interactions* 69, 293-317.

Skladanowski, A., Konopa, J., 1994a. Interstrand DNA crosslinking induced by anthracyclines in tumour cells. *Biochemical Pharmacology* 47, 2269-2278.

Skladanowski, A., Konopa, J., 1994b. Relevance of interstrand DNA crosslinking induced by anthracyclines for their biologic activity. *Biochemical Pharmacology* 47, 2279-2287.

Souza, S.M., Aquino, L.C., Milach, A.C. Jr., Bandeira, M.A., Nobre, M.E., Viana, G.S., 2007. Antiinflammatory and antiulcer properties of tannins from *Myracrodruon urundeuva* Allemao (Anacardiaceae) in rodents. *Phytotherapy Research* 21(3), 220-225.

Titenko-Holland, N., Windham, G., Kolachana, P., Reinisch, F., Parvatham, S., Osorio, A.M., Smith, M.T., 1997. Genotoxicity of malathion in human lymphocytes assessed using the micronucleus assay *in vitro* and *in vivo*: a study of malathion-exposed workers. *Mutation Research* 388 (1), 85-95.

Tuteja, N., Phan, T.N., Tuteja, R., Ochem, A., Falaschi, A., 1997. Inhibition of DNA unwinding and ATPase activities of human DNA helicase II by chemotherapeutic agents. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 236, 636-640.

Venkatesh, P., Shantala, B., Jagetia, G. C., Rao, K. K., Baliga, M. S., 2007. Modulation of dosorubicin-induced genotoxicity by *Aegle marmelos* in mouse bone marrow: A micronucleus study. *Integrative Cancer Therapies* 6, 42-53.

Vichi,P., Tritton,T.R., 1992. Protection from cell death by removal of extracellular drug. *Cancer Research* 52, 4135–4138.

Wagner, H., Bladt, S., Zgainsky,E., 1984. Plant drug analysis: A Thin. *Layer Chromatography Atlas*. Berlin, Springer, p. 163-192.

Wang, K.J., Zhang, Y.J., Yang, C.R., 2006. New phenolic constituents from *Balanophora polyandra* with radical-scavenging activity. *Chemistry and Biodiversity* 3(12), 1317-24.

Waters, M.D., Brady, A.L., Stack, H.F., Brockman, H.E., 1990. Antimutagenic profiles for some model compounds. *Mutation Research* 238, 57-85.

Wiseman, S.A., Balentine, D.A., Frei, B., 1997. Antioxidants of tea. *Food Science Nutrition* 37, 705-718.

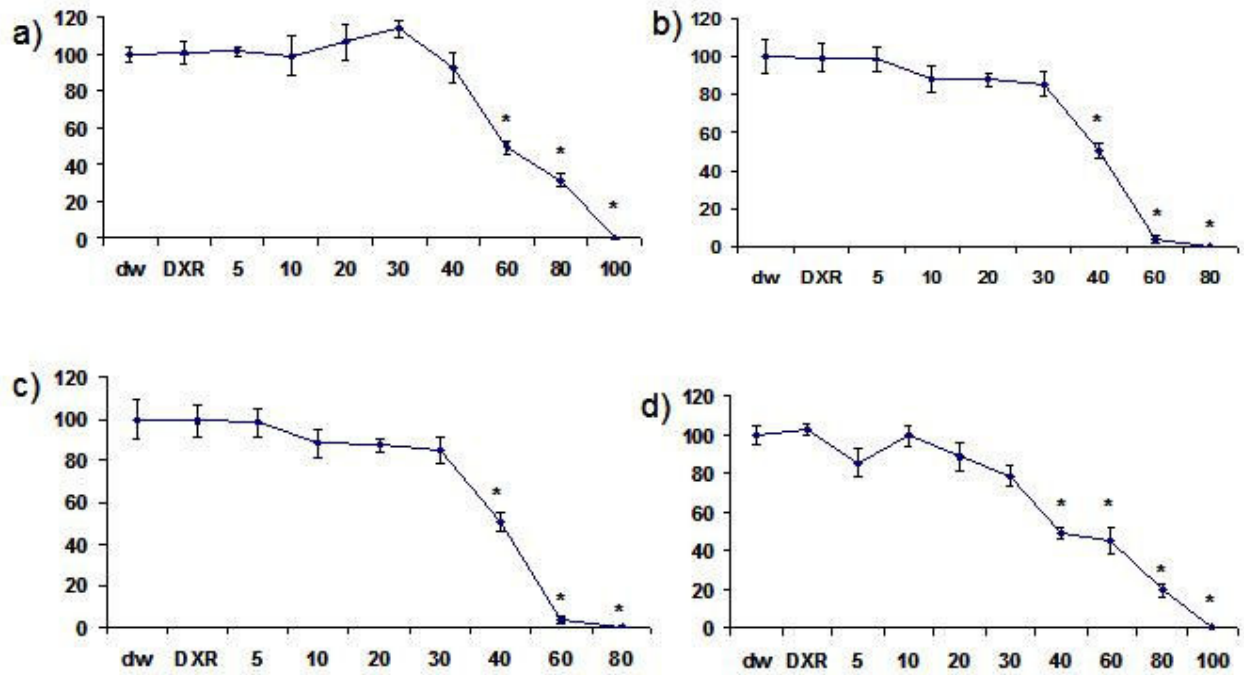


Figure 1: Percentage surviving fraction of colonies formed (Y axis) after treatment with different concentrations of the methanolic extracts (X axis) from: (a) *Miconia stenostachya*, (b) *Miconia cabucu*, (c) *Miconia albicans* and (d) *Miconia rubiginosa*.

dw: distillated water; DXR: doxorubicin

* Means different from that obtained to negative control group (p<0,05)

Table 1: Micronucleus (MN) frequencies and Nuclear Division Index (NDI) observed in V79 cells submitted to treatment with different concentrations of *Miconia* methanolic extracts and its respective controls.

MN frequencies in 1000 binucleated cells and NDI in 500 total cells		
	MN frequency	NDI
	Mean \pm S.D.	Mean \pm S.D.
Distillated water	3.67 \pm 1.53	1.900 \pm 0.014
DXR (1)	26.33 \pm 4.04*	1.900 \pm 0.026
(5)	4.67 \pm 1.53	1.740 \pm 0.170
<i>M. stenostachya</i> (10)	5.00 \pm 1.00	1.790 \pm 0.119
(20)	4.00 \pm 1.00	1.800 \pm 0.162
Distillated water	2.67 \pm 1.53	1.601 \pm 0.027
DXR (01)	25.00 \pm 2.00*	1.589 \pm 0.023
(5)	3.33 \pm 0.58	1.613 \pm 0.007
<i>M. rubiginosa</i> (10)	4.00 \pm 1.00	1.596 \pm 0.014
(20)	2.67 \pm 1.53	1.591 \pm 0.020
Distillated water	2.67 \pm 0.58	1.584 \pm 0.026
DXR (01)	27.67 \pm 1.15*	1.588 \pm 0.042
(5)	2.00 \pm 1.00	1.597 \pm 0.040
<i>M. albicans</i> (10)	2.67 \pm 1.53	1.589 \pm 0.012
(20)	1.67 \pm 1.15	1.619 \pm 0.017
Distillated water	2.67 \pm 0.58	1.607 \pm 0.030
DXR (01)	28.33 \pm 1.15*	1.617 \pm 0.018
(5)	2.67 \pm 0.58	1.617 \pm 0.024
<i>M. cabucu</i> (10)	3.00 \pm 1.00	1.609 \pm 0.047
(20)	2.67 \pm 1.53	1.604 \pm 0.024

SD = Standard deviation; Distillated water: negative control; Doxorubicin (DXR): positive control

*Means statistically different of the others (p<0.05).

Table 2: Micronucleus (MN) frequencies, Nuclear Division Index (NDI) and Reduction Percentage (%R) observed in V79 cells submitted to pre-treatment, simultaneous and post-treatment with different concentrations of *Miconia* extracts associated with doxorubicin (DXR) and its respective controls

Treatments (µg/mL)	MN frequencies in 1000 binucleated cells and NDI in 500 total cells											
	Pre-treatment					Simultaneous treatment					Post-treatment	
	MN frequency	NDI Mean ± S.D.	%R	MN frequency	NDI Mean ± S.D.	%R	MN frequency	NDI Mean ± S.D.	%R	MN frequency	NDI Mean ± S.D.	%R
Distilled water DXR (01)	3.67±0.58 ^a	1.870±0.049	-	3.67±1.53 ^a	1.900±0.026	-	3.67±0.58 ^a	1.870±0.049	-	3.67±0.58 ^a	1.870±0.049	-
	26.33±2.52 ^b	1.918±0.035	-	26.33±4.04 ^b	1.900±0.014	-	26.33±2.52 ^b	1.918±0.035	-	26.33±2.52 ^b	1.918±0.035	-
	8.00±2.65 ^a	1.897±0.034	80.9	10.33±1.15 ^c	1.850±0.078	70.6	5.67±1.15 ^a	1.934±0.010	91.2	5.67±1.15 ^a	1.934±0.010	91.2
<i>M. stenostachya</i> (10)	7.33±2.08 ^a	1.917±0.017	83.9	10.67±1.53 ^c	1.800±0.113	69.1	5.00±1.73 ^a	1.947±0.009	94.1	5.00±1.73 ^a	1.947±0.009	94.1
	7.33±2.08 ^a	1.928±0.023	83.9	12.33±3.21 ^c	1.820±0.087	61.8	5.67±1.53 ^a	1.942±0.013	91.2	5.67±1.53 ^a	1.942±0.013	91.2
Distilled water DXR (01)	3.33±0.58 ^a	1.566±0.024	-	2.67±1.53 ^a	1.601±0.027	-	3.33±0.58 ^a	1.566±0.024	-	3.33±0.58 ^a	1.566±0.024	-
	29.67±1.15 ^b	1.613±0.019	-	25.0±2.00 ^b	1.589±0.023	-	29.67±1.15 ^b	1.613±0.019	-	29.67±1.15 ^b	1.613±0.019	-
	13.00±1.00 ^c	1.598±0.020	63.3	10.67±3.21 ^c	1.615±0.010	64.2	9.33±0.58 ^c	1.623±0.016	77.2	9.33±0.58 ^c	1.623±0.016	77.2
<i>M. rubiginosa</i> (10)	11.67±0.58 ^c	1.608±0.020	70.7	11.00±2.00 ^c	1.587±0.017	62.7	8.67±1.53 ^c	1.606±0.021	79.7	8.67±1.53 ^c	1.606±0.021	79.7
	10.67±0.58 ^c	1.619±0.020	72.1	10.67±0.58 ^c	1.590±0.016	67.0	6.67±0.58 ^c	1.622±0.026	87.3	6.67±0.58 ^c	1.622±0.026	87.3
Distilled water DXR	2.67±0.58 ^a	1.601±0.030	-	2.67±0.58 ^a	1.607±0.030	-	2.67±0.58 ^a	1.601±0.030	-	2.67±0.58 ^a	1.601±0.030	-
	25.33±1.53 ^b	1.642±0.012	-	28.33±1.15 ^b	1.617±0.018	-	25.33±1.53 ^b	1.642±0.012	-	25.33±1.53 ^b	1.642±0.012	-
	8.67±1.53 ^c	1.609±0.049	73.5	12.67±1.53 ^c	1.621±0.027	61.0	6.00±1.00 ^a	1.589±0.029	88.6	6.00±1.00 ^a	1.589±0.029	88.6
<i>M. cabucu</i> (10)	9.33±0.58 ^c	1.588±0.043	70.6	12.00±2.65 ^c	1.603±0.003	63.6	6.33±1.53 ^c	1.597±0.013	83.9	6.33±1.53 ^c	1.597±0.013	83.9
	8.67±0.58 ^c	1.579±0.048	73.5	11.33±2.08 ^c	1.619±0.010	66.3	7.00±1.73 ^c	1.558±0.028	80.9	7.00±1.73 ^c	1.558±0.028	80.9
Distilled water DXR	2.33±0.58 ^a	1.626±0.042	-	2.67±0.58 ^a	1.584±0.026	-	2.33±0.58 ^a	1.626±0.042	-	2.33±0.58 ^a	1.626±0.042	-
	30.00±1.00 ^b	1.623±0.040	-	27.67±1.15 ^b	1.588±0.042	-	30.00±1.00 ^b	1.623±0.040	-	30.00±1.00 ^b	1.623±0.040	-
	7.33±1.53 ^c	1.596±0.026	81.9	10.33±1.53 ^c	1.615±0.027	69.4	6.00±2.65 ^a	1.633±0.042	86.8	6.00±2.65 ^a	1.633±0.042	86.8
<i>M. albicans</i> (10)	6.67±1.53 ^c	1.583±0.002	84.3	13.67±3.06 ^c	1.607±0.016	56.0	5.67±0.58 ^a	1.593±0.053	88.0	5.67±0.58 ^a	1.593±0.053	88.0
	7.00±1.00 ^c	1.626±0.016	83.1	13.00±1.73 ^c	1.603±0.006	58.7	6.00±0.90 ^a	1.652±0.033	86.7	6.00±0.90 ^a	1.652±0.033	86.7

SD = Standard deviation; Distilled water: negative control; Doxorubicin (DXR): positive control; Reduction Percentage (%R). Means with the same letter do not differ statistically (p<0.05)

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos resultados obtidos com o ensaio cometa e o teste do micronúcleo em sistema-teste *in vivo* realizados com os extratos de quatro espécies de plantas do gênero *Miconia* pode-se concluir que:

1) Todos os extratos avaliados apresentaram genotoxicidade nas três concentrações utilizadas e esta pode ser considerada moderada, uma vez que predominaram nesses grupos experimentais, cometas de classe 1.

2) As lesões detectadas no ensaio cometa podem ter sido passíveis de reparo, pois os extratos de *Miconia* não se apresentaram mutagênicos em nenhuma das concentrações avaliadas no teste do micronúcleo, tanto em células da medula óssea quanto do sangue periférico dos camundongos.

3) Todos os extratos apresentaram resultados semelhantes quanto à proteção das células do sangue periférico em ambos sistemas teste empregados, exibindo diminuição na frequência de danos no ensaio cometa e na frequência de células micronucleadas no teste do micronúcleo.

4) Em células da medula óssea somente os extratos de *Miconia stenostachya* e *Miconia rubiginosa* foram capazes de reduzir as frequências de células micronucleadas.

A partir dos resultados obtidos em cultura de fibroblastos de hamster Chinês (células V79) com os extratos das quatro espécies de plantas do gênero *Miconia* pode-se concluir que:

5) No ensaio clonogênico foram observadas diferenças na citotoxicidade dos extratos, sendo a espécie *M. albicans* a que apresentou citotoxicidade em menor concentração (30 mg/ml) e a espécie *M. stenostachya* em maior concentração (60 mg/ml).

6) O teste do micronúcleo nas células V79 para as quatro espécies de *Miconia* mostrou que nenhuma das três concentrações avaliadas foram mutagênicas e todas foram capazes de reduzir a frequência de células micronucleadas em relação ao grupo controle positivo (DXR).

Os resultados obtidos na avaliação da mutagenicidade dos extratos de *Indigofera truxillensis* e *Guapira noxia* em células da medula óssea de camundongos mostraram que:

7) Nenhuma das concentrações avaliadas para os extratos das duas espécies apresentou citotoxicidade.

8) Somente as maiores concentrações dos extratos de *Guapira noxia* foram mutagênicas.

A genotoxicidade observada para todos os extratos de *Miconia* reforça a importância de estudos toxicológicos mais amplos com essas plantas antes de sua recomendação para o uso como fitoterápicos. Além disso, são necessários também estudos de mutagenicidade de longa duração, uma vez que nos tratamentos medicinais humanos geralmente são utilizadas doses repetidas, por períodos prolongados.

De todos os extratos avaliados neste estudo o único a apresentar mutagenicidade foi o de *Guapira noxia*, nas maiores concentrações avaliadas. Tal atividade parece ser devida à presença de saponinas nos extratos dessa espécie.

Os efeitos protetores observados neste trabalho incentivam a busca por efeitos biológicos dos compostos isolados que, testados separadamente, podem comprovar ou não o efeito aditivo e o sinergismo propostos no presente trabalho como sendo os responsáveis pela proteção observada.

Todas as espécies avaliadas neste estudo apresentam indicações populares para o tratamento de uma série de doenças, a maior parte delas relacionada às disfunções no trato gastrointestinal. Assim, tornam-se relevantes os estudos com essas espécies utilizadas na medicina popular. A busca de atividades biológicas dessas e de outras espécies de vegetais tem sido realizada em estudos paralelos a este dentro do projeto Biota-FAPESP.