

LILIANE MENEZES FERNANDES

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE GENOTÓXICA DE EXTRATOS E
DO ALCALOIDE INDOL-MONOTERPÊNICO OBTIDOS DAS
RAÍZES DE *GALIANTHE THALICTROIDES* (RUBIACEAE)**

CAMPO GRANDE - MS
2011

LILIANE MENEZES FERNANDES

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE GENOTÓXICA DE EXTRATOS E
DO ALCALOIDE INDOL-MONOTERPÊNICO OBTIDOS DAS
RAÍZES DE *GALIANTHE THALICTROIDES* (RUBIACEAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro – Oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Walmir Silva Garcez

Co-orientadora: Profa. Dra. Zaira da Rosa Guterres

CAMPO GRANDE - MS
2011

Dedico esta dissertação a duas pessoas queridas Auci Fernandes e Maria Lúcia que sempre estiveram ao meu lado, não medindo esforços para que eu pudesse transformar meus sonhos em realidades, que sempre me conduziram pelos caminhos certos, me ensinando que com Deus à frente lutamos e saímos vencedores. A eles devo a pessoa que me tornei, sentindo-me orgulhosa por chamá-los de Pai e Mãe

AGRADECIMENTOS

Ao meu Deus, pelo dom da vida.

Aos meus Pais Auci Fernandes e Maria Lúcia M. M. Fernandes, meu irmão Vinicius M. Fernandes e a toda minha família, agradeço toda confiança, compreensão e apoio, contribuindo com o estímulo necessário até o final desta etapa.

Ao meu namorado Dener Casale Ferreira, pela sua tão imensa paciência, companheirismo e carinho dedicado.

Meu agradecimento especial à professora Msc. Ubirazilda Maria Resende, carinhosamente Bira. O mesmo sangue corre em nossas veias. Obrigada pelo incentivo e apoio dado nesta minha decisão.

Foi muito especial o meu caminho acadêmico por ter cruzado com o da querida professora Dra. Zaira da Rosa Guterres na UEMS, na cidade de Coxim, quando cursava o primeiro ano de Ciências Biológicas, no ano de 2004. Após esta data nossos caminhos novamente se cruzaram em 2008, quando suas ideias permearam meu trabalho e hoje posso agradecê-la pela imensa ajuda que me deste e pela sua amizade.

Ao meu orientador professor Dr. Walmir Silva Garcez a consideração de ter aceitado a orientação de minha dissertação, na esperança de retribuir, com a seriedade de meu trabalho, a confiança em mim depositada.

Ao professor Dr. Mário Sérgio Mantovani por me acolher em seu laboratório na cidade de Londrina.

Incluo, de forma especial, o nome do meu querido professor André Alves Ferreira que me ensinou as primeiras letras, na tradicional “Escola Ernesto Rodrigues”, obrigada tio André.

A Msc. Patrícia de Oliveira Figueiredo pela colaboração cedendo os extratos e o alcaloide indol-moterpênico estudado.

Ao Fábio Henrique Fernandes pela colaboração na realização deste trabalho e pela sua amizade.

A Fabiana Mesquita Roese pelo seu apoio durante a realização das disciplinas e pela sua amizade.

A todos os meus colegas do Departamento de Química, LP-1, em especial aos meus amigos do Bioensaios Felipe, Lilliam, Cleusa e Valquíria pela convivência nesse período.

Ao Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

Aos colegas da Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul - *campus* Mundo Novo e Universidade Estadual de Londrina – PR, por terem ajudado nos experimentos.

A CAPES, pela bolsa concedida.

Aos meus amigos que, de uma forma ou de outra, contribuíram com sua amizade e com sugestões efetivas para a realização deste trabalho, gostaria de expressar minha profunda gratidão.

A todos, meus agradecimentos!

“Deus nos concede talentos a fim de serem usados sabiamente, e não para serem mal empregados. A educação não é senão um preparo das faculdades físicas, intelectuais e morais, para o melhor desempenho de todos os deveres da vida.”

Ellen G. White

RESUMO

Fernandes LM. **Avaliação da atividade genotóxica de extratos e do alcaloide indol-monoterpênico obtidos das raízes de *Galianthe thalictroides* (Rubiaceae).** Campo Grande-MS, 2011. [Dissertação – Faculdade de Medicina Universidade Federal de Mato Grosso do Sul].

Na família Rubiaceae são encontradas espécies com importância alimentícia, econômica e farmacológica. Várias espécies desta família são utilizadas pela Medicina Tradicional para tratar diversos males. *Galianthe thalictroides*, pertence ao subgênero *Galianthe* que é exclusivo da América do Sul. No Brasil foram descritas 38 espécies, das quais 28 são endêmicas, encontradas em regiões de cerrado e campos rupestres. Raízes de *G. thalictroides* têm sido utilizadas pela medicina popular para tratar e prevenir o câncer e como não há dados na literatura sobre os efeitos citotóxicos e genotóxicos, o presente trabalho teve como objetivo avaliar estas atividades, utilizando ensaios *in vitro* (Citotoxicidade - MTT e Cometa) e *in vivo* (SMART). As atividades genotóxicas dos extratos aquosos, preparados a temperatura de 100°C (CGQ) e 4°C (CGF); das frações etanólica (BETER) e clorofórmica (BGTRC-6) e o alcaloide indol-monoterpênico (RC6-2) obtido a partir da fração clorofórmica (BGTRC-6) foram avaliados por meio do Teste para detecção de Mutação e Recombinação Somática – SMART. Os Ensaio de citotoxicidade (MTT) e do Cometa foram realizados somente com o alcaloide indol-monoterpênico (RC6-2). Os resultados obtidos no teste SMART indicam que os extratos aquosos (CGQ) e (CGF), em diferentes concentrações, não induziram aumentos estatisticamente significativos nas frequências de manchas mutantes, quando comparados com o controle negativo, não apresentando atividade genotóxica. Devido a este resultado somente o extrato aquoso (CGQ), foi associado a Doxorubicina (DXR), para avaliação de antigenotoxicidade. Os resultados indicaram que este extrato não reduziu os eventos mutacionais ocasionados pela DXR, não apresentando atividade antigenotóxica. Entretanto, a fração etanólica (BETER), uma vez metabolizada apresentou potencial genotóxico, dose resposta. A fração clorofórmica (BGTRC-6), nas concentrações de 0,4 e 0,8mg/mL, ocasionou eventos mutagênicos, expressos pelo aumento de manchas simples pequenas, estatisticamente significativo quando comparado ao controle negativo, e foi citotóxica na concentração 1,6mg/mL. O alcaloide indol-monoterpênico (RC6-2), apresentou eventos mutacionais significativos, com prevalência de manchas simples pequena, porém não foi citotóxico nas concentrações avaliadas no SMART. Entretanto, no Ensaio de Citotoxicidade (MTT) o alcaloide (RC6-2) apresentou elevada citotoxicidade nas concentrações de (10, 50 e 100µg/mL), porém, no Ensaio do Cometa, não ocasionou quebras de fitas de DNA, não apresentando atividade genotóxica. Os resultados obtidos com o teste SMART, somados aos encontrados no Ensaio do Cometa, sugerem que o alcaloide indol-monoterpênico (RC6-2), seja um inibidor do fuso mitótico, ocasionando aneugênese, uma vez que, apresentou potente atividade citotóxica frente à linhagem de células tumorais de hepatoma humano (HepG2) e não causou recombinação mitótica e sim atividade mutagênica em células somáticas de *Drosophila melanogaster*.

Palavras-chaves: Medicina Tradicional, Câncer, SMART, Ensaio do Cometa, Ensaio de Citotoxicidade (MTT).

ABSTRACT

Fernandes LM. **Evaluation of genotóxico activity of extracts and indole-monoterpene alkaloid obtained from the roots *Galianthe thalictroides* (Rubiaceae).** [Dissertation – Faculty of medicine, Universidade Federal of Mato Grosso do Sul]. Campo Grande, 2011.

In family Rubiaceae species are found with food, economic importance and pharmacological, several species of this family, are considered by traditional medicine as therapeutic to treat various diseases. *Galianthe thalictroides* belongs to the subgenus *Galianthe* that is unique in South America, in Brazil, were described 38 species of which 28 are endemic, found in regions of Savannah and grassland. *G. thalictroides* roots have been used in traditional medicine to treat and prevent cancer and how there is no data in the literature about the effects of cytotoxic and genotoxic, the present study aims to evaluate these activities, using in vitro assays (MTT and Comet) and in vivo (SMART). The genotoxic activity of aqueous extracts prepared in the temperature 100°C (CGQ) and 4°C (CGF); fraction ethanolic (BETER); fraction chloroform (BGTRC-6) and indole-monoterpene alkaloid (RC6-2) have been assessed by testing for the detection of Somatic Mutation and Recombination – SMART. The MTT assay and Comet were performed only with indole-monoterpene alkaloid (RC6-2). The results obtained in the SMART assay indicate that the aqueous extracts (CGQ) and (CGF), in different concentrations, not produced statistically significant increases in frequency spots mutants, when compared with the negative control, not showing genotoxic activity. Because of this result the aqueous extract (CGQ) was associated with doxorubicin (DXR) for evaluation of antigenotoxic. The results indicated that this extract did not reduce the events mutacionais caused DXR, not showing activity antigenotoxic. However, the fraction ethanolic (BETER), once presented genotoxic potential metabolised, dose response. The fraction chloroform (BGTRC-6) in the concentrations of 0.4 and 0.8mg/mL caused mutagenic events, expressed by simple stains increase small, statistically significant when compared to the negative control, and cytotoxic concentration was 1.6mg/mL. The indole-monoterpene alkaloid (RC6-1) obtained from the fraction chloroform (BGTRC-6), presented significant events mutacionais, but did not exhibit cytotoxic concentrations evaluated in SMART. However, in testing of MTT the alkaloid (RC6-2) presented in the concentrations of cytotoxicity (10, 50 and 100µg/mL), however, no assay Comet caused DNA tape breaks, not showing genotoxic activity. The results obtained with the SMART assay, added to those found in the Comet assay, suggest that the alkaloid (RC6-2), is a spindle inhibitor, causing aneugenic, potent cytotoxic activity presented against tumor cells lineage of human hepatoma (HepG2) and has not caused mitotic recombination and mutagenic activity in somatic cells of *Drosophila melanogaster*.

Keywords: Traditional Medicine, Cancer, SMART, Comet assay, MTT assay.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Esquema da placa usada para o teste de Citotoxicidade (MTT)	41
Tabela 2. Teste de toxicidade em <i>Drosophila melanogaster</i>	66
Tabela 3. Frequências de manchas mutantes observadas em asas de descendentes trans-heterozigotos marcados (<i>mwh/flr³</i>) de <i>D. melanogaster</i> do cruzamento padrão (ST) após tratamento com (CGF) e (CGQ).	67
Tabela 4. Frequências de manchas mutantes observadas em asas de descendentes trans-heterozigotos marcados (<i>mwh/flr³</i>) de <i>D. melanogaster</i> do cruzamento alta bioativação (HB) após tratamento com (CGF) e (CGQ).	68
Tabela 5. Frequências de manchas mutantes observadas em asas de descendentes trans-heterozigotos marcados (<i>mwh/flr³</i>) de <i>D. melanogaster</i> dos cruzamentos padrão (ST) e de alta ativação metabólica (HB) após tratamento com (CGQ) associado à DXR.	69
Tabela 6. Frequências de manchas mutantes observadas em asas de descendentes trans-heterozigotos marcados (<i>mwh/flr³</i>) de <i>D. melanogaster</i> dos cruzamentos padrão (ST) e de alta bioativação (HB) após tratamento com a fração BETER.	70
Tabela 7. Frequências de manchas mutantes observadas em asas de descendentes trans-heterozigotos marcados (MH) e heterozigotos balanceados (BH) de <i>D. melanogaster</i> do cruzamento de alta bioativação (HB) após tratamento com a fração BGTRC-6.....	71
Tabela 8. Frequências de manchas mutantes observadas em asas de descendentes heterozigotos balanceados (BH) e de descendentes trans-heterozigotos marcados (MH) de <i>D. melanogaster</i> do cruzamento de alta bioativação (HB) após tratamento com o alcaloide RC6-2.....	72
Tabela 9. Valores médios $\pm$ desvio padrão da absorbância obtida no Ensaio de Citotoxicidade (MTT), em células de hepatoma humano (HepG2).....	73
Tabela 10. Número médio de células com cometas, classes e escore de danos observados em células de hepatoma humano (HepG2) tratados com o alcaloide (RC6-2).	74

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Cerrado brasileiro original.....	19
Figura 2: Estrutura química do ácido ursólico.....	22
Figura 3: Substâncias isoladas de <i>G. brasiliensis</i>	22
Figura 4: Estruturas moleculares isolados de <i>G. ramosa</i>	23
Figura 5: Estrutura química do alcaloide isolado de <i>G. thalictroides</i>	24
Figura 6: Estrutura química da Vincristina e Vinblastina.	24
Figura 7: Mecanismo de formação de Micronúcleo (Aneugênese).	24
Figura 8: <i>Drosophila melanogaster</i>	31
Figura 9: Ciclo de vida da <i>D. melanogaster</i>	31
Figura 10: Fotomicrografias evidenciando os tipos de manchas mutantes encontradas. A – mancha simples com pelos múltiplos (<i>mwh</i>). B – mancha simples com pelos <i>flare</i> (<i>flr</i> ³). C – Mancha gêmea, com pelos múltiplos (seta maior) e pelos <i>flare</i> (seta menor) adjacentes.	32
Figura 11: Fotomicrografia de células de hepatoma humano (HepG2).	35
Figura 12: Exsicata de <i>Galianthe thalictroides</i>	37
Figura 13: Esquema utilizado para estudo das raízes de <i>G. thalictroides</i> , destacadas as substâncias testadas.	38
Figura 14: Critério de classificação para análise do Ensaio do Cometa. Coloração: Brometo de Etídeo. Microscopia de fluorescência, objetiva 40X.	42
Figura 15: Gráfico das frequências de manchas mutantes por indivíduos do cruzamento padrão (ST) e de alta biativação (HB) após tratamento com CGF e CGQ.	44
Figura 16: Gráfico das frequências de manchas mutantes por indivíduo resultantes dos cruzamentos ST (padrão) e de alta bioativação (HB) após tratamento com CGQ associado à DXR.	45
Figura 17: Gráfico das frequências de manchas mutantes por indivíduos dos cruzamentos padrão (ST) e de alta bioativação (HB) após tratamento com BETER.	46
Figura 18: Gráfico das frequências de manchas mutantes do cruzamento de alta bioativação (HB) dos descendentes heterozigotos balanceados (BH – <i>mwh/TM3</i>) e dos descendentes trans-heterozigotos marcados (MH – <i>mwh/flr</i> ³) após tratamento com BGTRC-6.	48

Figura 19: Gráfico das frequências de manchas mutantes por indivíduos do cruzamento de alta bioativação (HB), dos descendentes heterozigotos balanceados (BH - *mwh/TM3*) e dos descendentes trans-heterozigotos marcados (MH - *mwh/flr³*), após tratamento com RC6-2. **49**

Figura 20: Gráfico da absorbância média observada no Ensaio de Citotoxicidade (MTT) após tratamento de 24 horas com o alcaloide (RC6-2).....**51**

Figura 21: Gráfico do escore de danos observado em HepG2, após tratamento de 3 horas com o alcaloide RC6-2.....**52**

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

786-0 - Linhagem celular de carcinoma de rim
A549 – Linhagem celular de adenocarcinoma alveolar
B – Branco
B16-F10 – Linhagem Celular de melanoma murino
BETER- Extrato etanólico
BGTRC-6- Fração clorofórmica
CGF- Chá de *Galianthe thalictroides* frio
CGQ- Chá de *Galianthe thalictroides* quente
CN – Controle Negativo
DMSO - Dimetilsulfóxido
DNA- ácido dextrorribonucléico
DXR – Doxorubicina
HB – *High bioactivation*
Hep-2 – Linhagem celular de carcinoma de laringe
HepG2- Linhagem celular de hepatoma humano
HT29- Linhagem celular de carcinoma de cólon
IC₅₀ – Inibição de 50% de crescimento das células
INCA – Instituto Nacional de Câncer
K562 - Linhagem celular de leucemia
MCF7- Linhagem celular de carcinoma de mama
MRC-5 – Linhagem celular de fibroblastos de pulmão fetal humano
MTT- (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide)
NCI460 – Linhagem celular de carcinoma de pulmão
NCIADR - Linhagem celular de carcinoma de ovário
NHDF – Linhagem celular normal de fibroblastos dérmicos humanos
OVCAR - Linhagem celular de carcinoma de ovário
PBS- Tampão salina fosfato
PC3 - Linhagem celular de carcinoma de próstata
RC6-2- Alcaloide indol-monoterpênico: 1(hidroximetil)-3-(1-hidroxi-1-metiletil)-2-(5-metoxi-9H- β -carbolin-1-il)-ciclopentanol
S-180 - Linhagem celular de sarcoma 180
SBF- Soro Bovino Fetal

SMART- Teste para detecção de Mutação e Recombinação Somática

ST – *Standard cross*

U373 – Linhagem celular de glioblastoma humano

UACC62 – Linhagem celular de melanoma humano

UEL – Universidade Estadual de Londrina

UEMS- Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul

UFMS - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

V79-MZ – Cultura de fibroblastos de pulmão de *hamster*

LISTA DE SÍMBOLOS

% - Porcentagem

°C – Graus Celsius

µg - Micrograma

µL- Microlitro

cm²- Centímetro quadrado

mA – Miliampére

mg – Miligrama

mL – Mililitro

mM – Micromolar

N - Normal

rpm – Rotação por minuto

v – Volts

ÍNDICE

1.INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1 Plantas medicinais	17
2.2 Família Rubiaceae	18
2.3 <i>Galianthe thalictroides</i>	20
2.4 Metabólitos Secundários.....	25
2.4.1 Alcaloides e Taninos	25
2.5 Câncer.....	27
2.5.1 Genotoxicidade e Antigenotoxicidade.....	28
2.6 Ensaio biológicos.....	29
2.6.1 Teste para detecção de Mutação e Recombinação Somática (SMART)	29
2.6.2 Ensaio do Cometa.....	33
2.7 Ensaio de Citotoxicidade (MTT)	34
2.8 Cultura de Células	34
3.OBJETIVO GERAL	36
3.1.Objetivos Específicos	36
4.MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
4.1 Preparações dos Extratos e do Alcaloide Indol-monoterpênico	37
4.2.1 Ensaio de Toxicidade das Drosophilas	39
4.2.2 Estoque de Drosophilas e Cruzamentos.....	39
4.3 Linhagem Celular.....	40
4.4 Ensaio de Citotoxicidade (MTT)	40
4.5 Ensaio do Cometa	41
4.6 Análises Estatísticas	42
5.RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
5.1 SMART	43
5.2 Ensaio de Citotoxicidade (MTT) e Ensaio do Cometa.....	50
6.CONCLUSÕES	54
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54
APÊNDICES	66

1. INTRODUÇÃO

Desde o início da civilização, e ao longo dos séculos, quando o homem era acometido por doenças, fraturas, queimaduras ou de outros problemas de saúde, aprendeu manusear, adaptar e modificar as plantas e seus extratos para seu próprio benefício (RATES, 2001), surgindo assim à medicina natural. Esta, também chamada de Medicina Tradicional, é encontrada em diferentes civilizações, tais como Egípcia, Chinesa, Japonesa, Coreana e Grego-Árabe (ANSARI e INAMDAR, 2010).

A prática da medicina natural foi transmitida de geração em geração e mesmo no século XXI as plantas medicinais são amplamente utilizadas, cultivadas em quintais residenciais ou coletadas em seu *habitat* natural, comercializadas em feiras livres e mercados populares. Os efeitos atribuídos aos constituintes de uma planta no organismo vivo são detectados com base nos conhecimentos populares originado do uso repetitivo e tradicional (RATES, 2001).

Sabe-se que os vegetais possuem agentes fitoquímicos com diversas ações terapêuticas, tais como efeitos: antiinflamatório, antioxidante, antimutagênico e anticarcinogênico (NAKAMURA *et al.*, 1997, RIBEIRO *et al.*, 2003).

Apesar de muitas ações benéficas das plantas, alguns de seus constituintes podem ser tóxicos e pode causar intoxicações, problemas hepáticos, gástricos e alterações no DNA (tais como deleção e recombinação) (AMES, 1983; RATES, 2001; MARQUES *et al.* 2003). Para garantir a segurança no uso de plantas, deve ser comprovado que sua utilização não traz riscos à saúde humana por meio de estudos farmacológicos e toxicológicos, sendo então necessária a avaliação de uma possível atividade citotóxica, genotóxica e/ou mutagênica deste agente.

Galianthe thalictroides (Rubiaceae), conhecida popularmente como Baicuru, têm sido utilizada pela medicina popular sul-mato-grossense para tratar e prevenir o câncer. No Laboratório de Química de Produtos Naturais (LP1) da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS) foi realizado o estudo fitoquímico desta planta, no qual resultou o isolamento de alguns metabólitos secundários (FIGUEIREDO, 2010).

Como não há dados na literatura especializada sobre os efeitos citotóxicos e genotóxicos para extratos e metabólitos secundários isolados desta planta, o presente trabalho teve como objetivo avaliar esses efeitos e encontrar nos resultados dos testes laboratoriais evidências que comprovem ou refutem sua eficácia conforme preconizado pelo uso popular.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Plantas medicinais

A utilização de plantas como recurso terapêutico é uma prática generalizada na medicina popular e tem aumentado acentuadamente nas últimas décadas. Porém muitas plantas apresentam em sua constituição química alguns compostos que podem representar sérios riscos à saúde humana (RATES, 2001), pois plantas consideradas medicinais podem conter substâncias tóxicas, citotóxicas e mutagênicas.

De acordo com a Organização Mundial da Saúde, cerca de 80% da população mundial faz uso de tratamentos ou medicamentos sugeridos pela chamada Medicina Tradicional (BASSO *et al.*, 2005). Entretanto, nos países industrializados criou-se uma resistência ao uso de medicamentos tradicionais, principalmente devido à crença na ineficácia desses elementos frente aos medicamentos alopáticos. O estudo de plantas para cura de doenças humanas voltou a tomar força no final do século passado, provavelmente devido a dois fatores: 1) o reconhecimento das farmacopéias tradicionais como importante fonte de tratamentos acessíveis; 2) a ideia de que esses tratamentos seriam mais seguros e eficientes do que os baseados em medicamentos alopáticos (ELVIN-LEWIS, 2001).

Esse reconhecimento deve-se especialmente ao fato das pessoas tomarem consciência de que grande parte dos medicamentos alopáticos produzidos e consumidos é de alguma forma baseado em produtos naturais, sendo, a maioria, derivados de espécies vegetais (RATES, 2001).

Muitas das drogas derivadas de plantas foram originalmente descobertas, por meio do estudo de plantas utilizadas na Medicina Tradicional, Chinesa e Indiana (Ayurveda), que são as mais difundidas ao redor do mundo.

A Medicina Tradicional Chinesa utiliza diversos recursos naturais em tratamentos terapêuticos há mais de 5000 anos. Essa terapia medicinal baseia-se na mistura de diferentes plantas e até mesmo de produtos de origem animal e/ou mineral, para que os compostos presentes nestes elementos interajam entre si para tornarem-se eficiente na cura de doenças (ELVIN-LEWIS, 2001; YONG e LING, 2006).

As ervas são geralmente usadas em combinação, na crença de que estas associações aumentem os seus benefícios e, simultaneamente, reduzam os efeitos colaterais. O componente principal dessa combinação, geralmente adicionado em maior quantidade, é o responsável pelo efeito terapêutico desejado; já os demais componentes

tratam dos sintomas periféricos, reduzem os efeitos tóxicos ou direcionam o componente majoritário ao órgão alvo (YONG e LING, 2006).

A Medicina Indiana (Ayurveda) é uma das mais conhecidas formas de tratamento medicinal baseada em conhecimentos tradicionais (SMIT *et al.*, 1995). De acordo com Smit *et al.* (1995) algumas plantas empregadas pela Medicina Tradicional indiana no tratamento de diferentes tipos de câncer apresentam atividade citotóxica frente às linhagens de células tumorais.

A Medicina Popular Brasileira apresenta influências de várias culturas (indígena, africana e europeia), utilizando as plantas para tratar de diversas doenças. Em geral o conhecimento popular é desenvolvido por grupamentos culturais que ainda convivem intimamente com a natureza, observando-a de perto no seu dia-a-dia e, explorando suas potencialidades, mantendo vivo e crescente esse patrimônio pela experimentação sistemática e constante (ELISABETSKY, 1997).

Usar chás e extratos de plantas para tratar doenças é uma prática popular, no Mato Grosso do Sul e esta sofre influência da cultura indígena. Entretanto, são poucos os relatos encontrados na literatura, sobre as plantas da família Rubiaceae. A detecção e avaliação da citotoxicidade e efeitos genotóxicos de compostos das plantas são de fundamental importância para minimizar os possíveis riscos a saúde do consumidor. Plantas da família Rubiaceae são usadas na Medicina Tradicional para o tratamento de várias doenças. Mas a eficácia e a segurança do uso de suas preparações não foram comprovadas cientificamente até o momento.

2.2 Família Rubiaceae

O Brasil possui cinco biomas principais, os quais apresentam um grande número de plantas nativas. O Cerrado (Figura 1) é a segunda maior formação. Estendia-se originalmente por uma área de 2 milhões de Km², abrangendo dez estados do Brasil Central. Hoje, restam apenas 23% desse total. Típico de regiões tropicais apresenta duas estações bem marcadas: inverno seco e verão chuvoso. Em termos de riqueza de espécies no Cerrado, a flora deve ser superada apenas pelas florestas Amazônica e Atlântica (MENDONÇA *et al.*, 1998).

Neste bioma são encontradas cerca de 170 famílias de plantas (BOLZANI *et al.* 2001), entre elas a Rubiaceae, que inclui inúmeras espécies utilizadas pela medicina popular no tratamento de diversas enfermidades, tais como: hepatite, apendicite,

infecção das vias urinárias e para combater o desenvolvimento de câncer de fígado, pulmão e estômago (XU *et al.*, 1997).



Figura 1: Cerrado brasileiro original

Fonte: <http://www.portalsaofrancisco.com.br/alfa/cerrado/>
Acessado em 04/08/2010

Esta família possui espécies de grande importância econômica, as quais são exploradas como alimentícias (*Coffea arabica* L. e *Genipa americana* L.), ornamentais (*Ixora* spp., *Mussaenda* spp., *Gardenia* spp. etc.), e também na indústria farmacêutica, como por exemplo *Cinchona pubescens* Vahl, produtora de quinina, empregada no tratamento da malária. Além disso, várias espécies são referidas popularmente como medicinais e/ou tóxicas, dentre as quais se destacam: *Coutarea hexandra* (Jacq.) K. Schum. e diversas espécies dos gêneros *Borreria*, *Cinchona*, *Richardia*, como medicinais; *Palicourea* e *Psychotria*, popularmente conhecidas como “mata-ratos”, consideradas venenosas (COELHO *et al.*, 2006).

A família Rubiaceae destaca-se pela presença de metabólitos secundários, tais como alcaloides quinolínicos (quinina e cinchonina), isoquinolínicos (emetina), indólicos (iombina) e bases de purina como a cafeína (STRUWE, 2002; SCHRIPSEMA *et al.*, 2003).

Estudos fitoquímicos realizados com as espécies brasileiras de Rubiaceae, *Guettarda platypoda* e *Guettarda angélica* constatarem a presença de saponinas derivadas do ácido quinóico, alcaloides indólicos e quinolínicos, ácidos clorogênicos, iridóides e secoiridóides (SOUZA *et al.*, 1986; CAPASSO *et al.*, 1998); enquanto que de

Machaonia brasiliensis e *Chomelia obtusa* foram isolados o iridóide secologanosídeo, flavonóides, ácidos clorogênicos, ácidos ursólico e oleanólico, e saponinas derivadas dos ácidos quinóvico e cinchólico (SANTOS *et al.*, 2004; BARROS *et al.*, 2008); das raízes de *Guettarda pohliana* Müll. Arg. foram isolados saponinas triterpênicas e de *Chimarrhis turbinata* alcaloides indólicos monoterpênicos (OLIVEIRA *et al.*, 2008).

Em estudos farmacológicos prévios, utilizando extratos obtidos de *Oldenlandia diffusa* (Rubiaceae), foram demonstradas atividades antitumoral, imunomodulatória (YOSHIDA *et al.*, 1997; SHAN *et al.*, 2001) e antimutagênica (WONG *et al.*, 1992a, b, 1993a, b, 1996).

Os dados da literatura indicam o potencial biológico de plantas pertencentes à família Rubiaceae. Em relação à espécie *G. thalictroides* existe apenas um estudo sobre seu potencial citotóxico e composição fitoquímica (realizado na UFMS) (FIGUEIREIDO, 2010), tornando assim necessários mais estudos com esta planta para comprovar seu potencial citotóxico em outro sistema teste e também a sua atividade genotóxica.

2.3 *Galianthe thalictroides*

Classificação Botânica

Reino: Magnoliophyta

Classe: Magnoliopsida

Ordem: Gentianales

Família: Rubiaceae

Subfamília: Rubioideae

Gênero: *Galianthe*

Espécie: *Galianthe thalictroides*

Nome popular: Baicuru

O gênero americano *Galianthe* é constituído por 49 espécies as quais estão divididas em dois subgêneros: *Galianthe* e *Ebelia*. O subgênero *Galianthe* é exclusivo da América do Sul, encontrado no Brasil, Paraguai e Argentina. No Brasil, foram descritas 38 espécies das quais 28 são endêmicas, podendo ser encontradas em regiões de cerrado, campos rupestres e campos baixos (CABRAL, 2001).

G. thalictroides é uma planta de distribuição restrita no planeta, havendo no *Missouri Botanic Garden* (<http://mobot.org>) e no *Global Biodiversity Information Facility* (www.gbif.net) referência a apenas três coletas, sendo uma na Argentina e duas no Paraguai. Não foram encontrados na literatura registros de coletas de *G. thalictroides* no Brasil. Por apresentar distribuição restrita, esta planta ainda não possui estudos quanto à sua constituição química e nem quanto às possíveis propriedades biológicas. Porém, vem sendo comercializada por “raizeiros” e indicada para o tratamento de câncer. Suas raízes são usadas, popularmente, no preparo de extratos aquosos em forma de chás, “garrafadas” e adicionadas a erva do tereré (bebida tradicional da região). Também é utilizada por pessoas não diagnosticadas com câncer que fazem uso da planta com a intenção de prevenirem-se da doença (FIGUEIREDO, 2010).

De plantas pertencentes ao gênero *Galianthe* foram isolados sitosterol, estigmasterol, campesterol, ácido ursólico, iridóides glicosilados (asperulosídeo e deacetilasperulosídeo) (CARVALHO E FOGLIO, 2006; TUNDIS *et al.*, 2008).

Das partes aéreas de *Galianthe brasiliensis* foram obtidos o ácido ursólico (Figura 2), asperulosídeo e deacetilasperulosídeo (Figura 3). O extrato bruto das partes aéreas desta planta apresentou atividade antiproliferativa em culturas de células tumorais humanas de melanoma (UACC62), mama (MCF7), pulmão (NCI460), leucemia (K562), ovário (OVCAR), próstata (PCO3), cólon (HT29), rim (786-0) e mama resistente (NCIADR), esta última expressa o fenótipo de resistência a múltiplos fármacos (CARVALHO E FOGLIO, 2006).

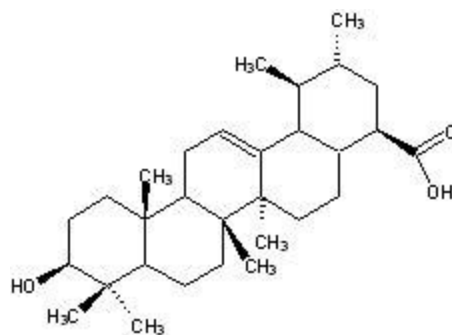


Figura 2: Estrutura química do ácido ursólico.

Fonte: <http://www.abq.org.br>

Acessado em 12/03/2011

A atividade antiproliferativa observada para o extrato bruto das partes aéreas de *G. brasiliensis* pode ser atribuída, em termos, às substâncias ácido ursólico (HSU *et al.*, 2004) e asperulosídeo (NAKAMURA *et al.*, 1997), que possuem comprovada atividade antitumoral.

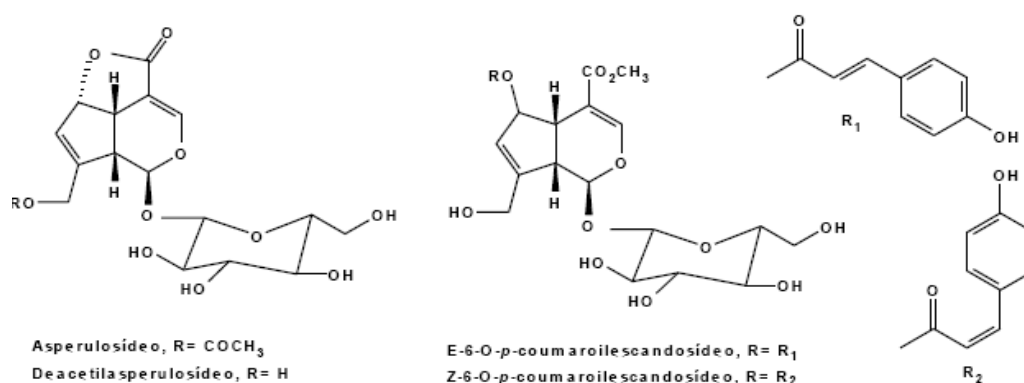


Figura 3: Substâncias isoladas de *G. brasiliensis*.

Fonte: Figueiredo, 2010

A atividade citotóxica do extrato metanólico de *Galianthe ramosa* foi avaliada frente às linhagens de células tumorais K-562 (leucemia mieloide crônica) e S-180 (sarcoma-180). O extrato não apresentou ação citotóxica, uma vez que, nas concentrações testadas, foi relatada uma alta porcentagem de proliferação das linhagens celulares utilizadas (SILVA *et al.*, 2007). O estudo químico do referido extrato, resultou no isolamento de dois alcaloides β -carbolínicos ligados a uma unidade tetrahydrofurano (Figura 4) (SILVA *et al.*, 2007; SILVA *et al.*, 2008).

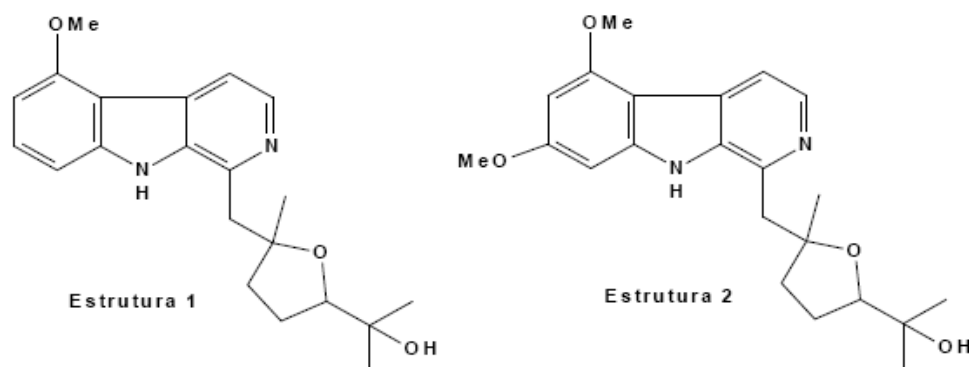


Figura 4: Estruturas moleculares isolados de *G. ramosa*.

Fonte: Figueiredo, 2010

Diversos metabólitos secundários isolados de vegetais tem propriedades citotóxica, apoptótica e genotóxica, sendo utilizados como antitumoral. As plantas e seus produtos representam uma das principais fontes de compostos com potencial quimiopreventivo e sem dúvida, os metabólitos secundários são os responsáveis por esta atividade (KINGHORN *et al.*, 2004). Estudos epidemiológicos e análises experimentais têm sido feitos com o objetivo de validar cientificamente a atividade dos constituintes naturais capazes de modular os processos de mutagênese ou carcinogênese (SÁNCHEZ-LAMAR *et al.*, 1999). Em relação à espécie *G. thalictroides* foi realizado na UFMS um estudo fitoquímico, do qual foram caracterizados metabólitos secundários, tais como taninos hidrolisáveis e alcaloides, sendo um inédito na literatura (Figura 5) (FIGUEIREDO, 2010).

Para o tratamento do câncer são empregados os alcaloides da vinca, como por exemplo, a vincristina e a vinblastina (Figura 6) que são antimitóticos, pois impedem a polimerização da tubulina, impedindo a formação do fuso mitótico durante a divisão celular ocasionado aneugênese (Figura 7). O alcaloide indol-monoterpênico 1-(hidroximetil)-3-(1-hidroxi-1-metiletil)-2-(5-metoxi-9H- β -carbolin-1-il)-ciclopentanol – RC6-2 obtido por Figueiredo, 2010, possui uma parte de sua estrutura química semelhante aos alcaloides da vinca.

Frente a estes dados verifica-se a necessidade de dar prosseguimento ao estudo dessa planta e do respectivo alcaloide, pois há possibilidade de sua aplicação como um quimioterápico no tratamento do câncer.

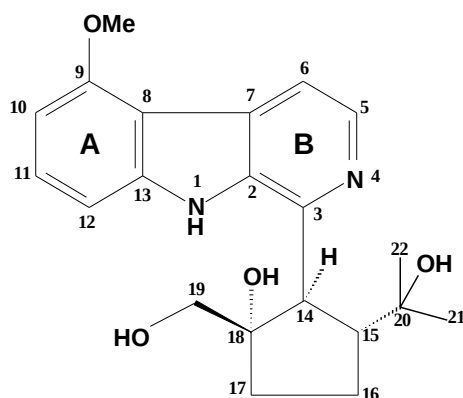


Figura 5: Estrutura química do alcaloide isolado de *G. thalictroides*.

Fonte: Figueiredo, 2010

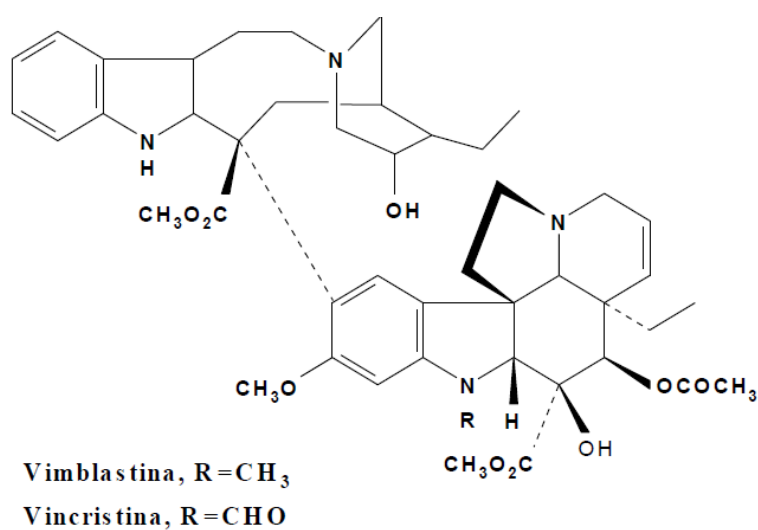


Figura 6: Estrutura química da Vincristina e Vinblastina.

Fonte: Figueiredo, 2010

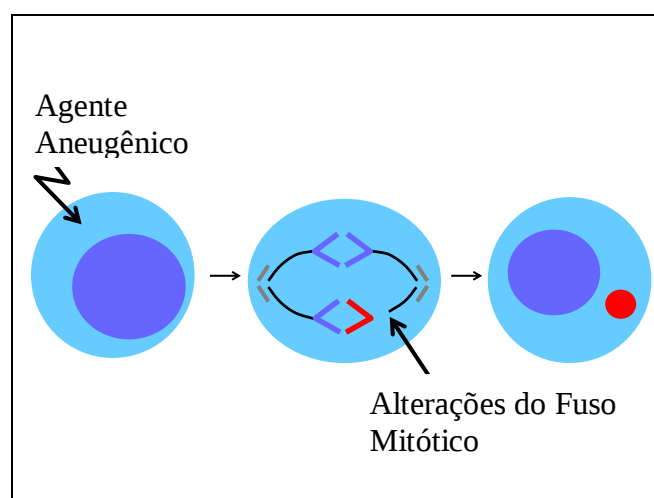


Figura 7: Mecanismo de formação de Micronúcleo (Aneugênese).

Fonte: Iarmarcovai *et al.*, 2007 (Adaptado)

2.4 Metabólitos Secundários

Os organismos vivos possuem rotas metabólicas denominadas de metabolismo primário e secundário. O metabolismo primário é o responsável pela síntese de substâncias essenciais à vida da planta. No entanto, muitas organelas e enzimas sintetizam compostos orgânicos que não estão diretamente ligados ao crescimento e/ou desenvolvimento do organismo. Porém conferem vantagens relacionadas, principalmente, à fecundidade e sobrevivência. Estas vias metabólicas recebem o nome de metabolismo secundário e, diferentemente do primário, não estão distribuídos igualmente em todos os grupos taxonômicos, sendo algumas delas exclusivas de poucos organismos (CROTEAU *et al.*, 2000).

Sabe-se que metabólitos secundários são compostos extremamente úteis para defesa e proteção, principalmente para plantas, que são organismos fixos, susceptíveis às mudanças e aspectos do ambiente. Algumas das funções relatadas são proteções contra herbivoria, infecções microbianas, atração de polinizadores, agentes alelopáticos e proteção contra raios ultravioletas (VERPOORTE, 1998; CROTEAU *et al.*, 2000).

Considerando que muitos destes compostos são bioativos, a pesquisa com metabólitos secundários é extremamente relevante para a indústria farmacêutica, uma vez que muitos medicamentos têm como origem moléculas orgânicas provenientes do metabolismo secundário, principalmente de plantas (SANTOS, 2000; CROTEAU *et al.*, 2000). Uma grande diversidade de metabólitos secundários já foi isolada de plantas da família Rubiaceae, encontradas no Brasil, tais como iridoides, alcaloides indólicos, antraquinonas, flavonoides, derivados fenólicos, triterpenos, diterpenos e outros tipos de alcaloides (BOLZANI *et al.*, 2001).

2.4.1 Alcaloides e Taninos

Os alcaloides são compostos nitrogenados, encontrados predominantemente em angiospermas, principalmente nas famílias Apocynaceae, Papaveraceae, Ranunculaceae, Rubiaceae, Solanaceae e Berberidaceae. Um alcaloide pode ser definido como uma substância orgânica cíclica contendo um nitrogênio em um estado de oxidação negativo e cuja distribuição é limitada entre os organismos vivos, englobando a maioria dos compostos considerados como alcaloides (PELLETIER, 1983 *apud* BHAT *et al.*, 2007).

A família Rubiaceae destaca-se por apresentar vários representantes produtores de alcaloides, muitos deles são bioativos. Até o ano de 2001 foram estudados 57 gêneros e 181 espécies dessa família, o que resultou no isolamento de cerca de 680

alcaloides. A família Rubiaceae produz alcaloides pertencentes a mais de dez classes diferentes, onde se destacam: os isoquinolínicos, com 44 substâncias elucidadas; os quinolínicos com 70 alcaloides; e os indólicos, com 391 compostos isolados (CORDELL *et al.*, 2001).

Os alcaloides apresentam uma ampla bioatividade, tais como: efeitos antiespasmódicos, antitumorais, antialérgicos, estimulantes do Sistema Nervoso Central, analgésicos, controle da pressão sanguínea, entre outros (GUDI *et al.*, 1990).

Os alcaloides indólicos compreendem um grupo de ampla ocorrência em produtos naturais com diversos padrões de estruturas químicas. Um exemplo é a vimblastina, antimitótico, que ocasiona aneugênese. Muitos alcaloides apresentam efeitos farmacológicos em mamíferos e outros organismos e, com isso, constituem importantes agentes terapêuticos e/ou medicinais. Alguns exemplos mais comuns são cafeína, cocaína, nicotina, estricnina e morfina (GUDI *et al.*, 1990.; MORIKAWA *et al.*, 2004).

Na família Rubiaceae encontram-se também os taninos que são compostos polifenólicos, distribuídos em plantas, alimentos e bebidas, ocorrendo aproximadamente em 30% das plantas; são solúveis em água e solventes orgânicos polares, sendo capazes de precipitar proteínas (ZUCKER, 1983).

Taninos apresentam propriedade adstringente e são de difícil digestão. Estas características são à base de algumas propriedades biológicas dos taninos, tais como o controle de insetos, fungos e bactérias (AERTS *et al.*, 1999). Plantas ricas em taninos são usadas na indústria alimentícia como antioxidante de sucos de frutas, como clarificante de vinhos e no curtimento de couro.

Os taninos também são empregados na Medicina Tradicional no tratamento de diversas doenças, tais como diarreia, hipertensão arterial, reumatismo, hemorragias, feridas, queimaduras, problemas renais, processos inflamatórios e o câncer. Estes compostos possuem atividade antioxidante e tem capacidade de se complexar com macromoléculas de natureza proteica (enzimas digestivas, proteínas fúngicas e proteínas virais) (SANTOS-MELO, 1999; DE BRUYNE, 1999).

2.5 Câncer

Os extratos de plantas estão entre as fontes mais atraentes de novos medicamentos e, em particular, têm produzido resultados promissores no tratamento de diversas doenças, dentre elas o câncer. Segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA), o câncer é o termo empregado para designar um conjunto de mais de 100 doenças que possuem em comum o crescimento desordenado de células que invadem os tecidos e órgãos.

As alterações genéticas que promovem o desenvolvimento do câncer ocorrem em genes reguladores do crescimento, que estão presentes em células normais: 1) os proto-oncogenes que promovem o crescimento; 2) os genes supressores de tumor que inibem o crescimento celular. As alterações ocorridas nesses dois genes podem provocar o desenvolvimento de células com crescimento descontrolado. Algumas células podem ser capazes de invadir outros tecidos (metástase) (INCA, 2008).

O câncer é um problema de saúde pública para países desenvolvidos e em desenvolvimento, sendo que nos países em desenvolvimento são diagnosticados 55% dos 10 milhões de novos casos por ano. Esta doença é responsável por mais de 7,6 milhões de mortes por ano, o que representa 13% de todas as causas de óbitos do mundo. Os principais tipos de câncer relacionados com mortalidade são os de pulmão (1,3 milhões mortes/ano), estômago (aproximadamente 1,0 milhão mortes/ano), fígado (662 mil mortes/ano), cólon (655 mil mortes/ano) e mama (502 mortes/ano). Estimativas sugerem que a mortalidade por câncer continue aumentando, chegando a 9,0 milhões de mortes em 2015 e 11,4 milhões em 2030 (INCA, 2010).

O câncer pode ser prevenido, por meio da quimioprevenção, pela utilização de compostos naturais ou sintéticos, para suprimir, atrasar ou reverter o desenvolvimento invasivo do câncer (PATEL *et al.*, 2007). Além disso pode ser tratado também por radioterapia ou quimioterapia.

A quimioterapia consiste no método da utilização de compostos químicos, chamados quimioterápicos (INCA, 2010). Diversas substâncias sintéticas ou derivadas de plantas com atividades citotóxicas e/ou genotóxicas, tais como taxol e a vincristina, são empregadas na quimioterapia. A busca por novas entidades químicas que apresentem propriedades anticancerígenas tem aumentado nas últimas décadas, isto se deve a busca por tratamentos mais efetivos e seletivos, ou que visem à descoberta de novas estratégias que impeçam o avanço do câncer. Pesquisas atuais buscam moléculas

que atuem com mecanismos específicos para cada tipo de enfermidade, como inibição das topoisomerases, da polimerização da tubulina, e das quebra e recombinações do DNA (ALTMANN e GERTSCH, 2007).

Avaliar o papel citotóxico, genotóxico e/ou antígenotóxico de extratos de plantas e dos principais componentes fitoquímicos é de suma importância, visto que substâncias antimutagênicas presentes em algumas plantas podem auxiliar na prevenção de câncer e de outras doenças (PATEL *et al.*, 2007). Assim, os estudos com plantas têm crescido juntamente com o aumento do uso terapêutico e com o interesse em comprovar a eficácia destas nas mais diversas finalidades farmacológicas (ROMERO-JIMÉNEZ *et al.*, 2005).

2.5.1 Genotoxicidade e Antigenotoxicidade

Genotoxicidade é a capacidade que algumas substâncias têm de induzir alterações no material genético de organismos a elas expostos. Essas alterações são responsáveis pelo surgimento de cânceres e doenças hereditárias (SILVA, 2003). A grande maioria dos carcinógenos inicia sua atividade tumoral através de interações com o DNA, o que resulta lesões genéticas permanentes, chamadas de mutações gênicas e/ou mutações cromossômicas, que altera o ciclo celular (REIS *et al.*, 2002).

A genotoxicidade está relacionada ao potencial que agentes físicos ou químicos possuem de induzir mutações em células somáticas ou células germinativas (SILVA *et al.*, 2000). Os agentes que mudam a sequência do DNA são tóxicos ao gene. Portanto, estes chamados de genotóxicos, são capazes de induzir instabilidade cromossômica, representadas por aberrações cromossômicas principalmente deleções, translocações, recombinações ou ganho ou perda de cromossomos inteiros. Estes eventos contribuem para o desenvolvimento de processos celulares malignos (MARQUES *et al.*, 2003).

A detecção de substâncias naturais que atuem como antineoplásicos ou que possam modular os efeitos genotóxicos de agentes químicos e físicos é de grande importância, podendo auxiliar no entendimento dos mecanismos celulares de mutagênese, assim como fornecendo informações para a prevenção das alterações gênicas que podem resultar no aparecimento de doenças.

Antigenotoxicidade é o processo no qual ocorre inibição das taxas de mutações nos seres vivos, e conseqüentemente a incidência de câncer. Para a prevenção de doenças como o câncer, existe a alternativa da quimioproteção que é baseada na

modulação do mecanismo de defesa, através da ingestão de alimentos e medicamentos que possuem mecanismos potenciais de prevenção ao câncer e são efetivos em modelos de estudos pré-clínicos. (De FLORA *et al.*, 2001).

Os agentes antígenotóxicos são compostos que reduzem a ocorrência de mutações espontâneas e/ou induzidas. Estes são classificados em dois tipos: os agentes desmutágenos e os bioantimutagênicos. Os desmutágenos são os agentes que reduzem o efeito genotóxico do agente xenobiótico, interagindo diretamente com o mutágeno ou bloqueando seus efeitos, inibindo sua ativação metabólica, ou aumentando sua detoxificação. Já os bioantimutagênicos são os agentes que agem depois da ocorrência do dano, promovendo reparo do DNA, aumentando a fidelidade de replicação do DNA e inibindo os erros inclinados a replicação de células com DNA danificado (MERSCH-SUNDERMANN, *et al.* 2004).

2.6 Ensaios biológicos

A maioria dos testes de detecção de danos genéticos busca agentes que possam afetar o genoma de um organismo. Devido à universalidade do código genético, se um agente puder causar danos ao DNA terá potencial genotóxico em qualquer tipo de célula (animal, vegetal ou microrganismo). Entretanto diferentes organismos possuem metabolismo, mecanismos de reparação e de detoxificação que variam consideravelmente, tornando diferente a resposta destes organismos a agentes quimiopreventivos. Por isso a eficácia dos agentes quimiopreventivos deve ser avaliada por vários sistemas, em experimentos *in vivo* e *in vitro* (De FLORA e RAMEL, 1998).

2.6.1 Teste para detecção de Mutação e Recombinação Somática (SMART)

O Teste para detecção de Mutação e Recombinação Somática (*Somatic Mutation and Recombination Test* – SMART) baseia-se em mutações encontradas nos tricomas que revestem as asas de *Drosophila melanogaster* (Figura 8). A vantagem de utilizar a *D. melanogaster* deve-se ao fato de ser um organismo eucarioto com ciclo de vida curto, aproximadamente de 10-12 dias a 25°C (Figura 9). Durante a metamorfose, grupos de células que originarão as asas (discos imaginais) sofrem sucessivas mitoses até se diferenciar completamente. As moscas utilizadas são portadoras de dois genes marcadores para a forma dos pelos das asas: pelos múltiplos, do inglês *multiple wing hair* (*mwh*, 3-0.3) e pelos cujo formato lembra uma chama de vela, do inglês *flare* (*flr*³,

3-38.8), baseado na indução de alterações genéticas as quais originam a perda de heterozigose em células larvais, que são heterozigotas para estes dois genes recessivos (GRAF *et al.*, 1984).

Durante as sucessivas mitoses das células que originarão as asas, podem ocorrer alterações genéticas, levando ao aparecimento de manchas mutantes. Estas regiões são detectadas ao se analisar a diferente forma dos pelos ou tricomas que expressam fenotipicamente os genes *mwh* ou *flr*³ (Figura 10). Na análise das lesões induzidas, pode-se contabilizar o número total de manchas e/ou o tipo de mancha encontrada, sendo que o primeiro aspecto fornece dados quantitativos, enquanto o segundo elucida o tipo de lesão ocorrida (GRAF *et al.*, 1984).

Os dois tipos de manchas possíveis são: manchas simples (somente *mwh* ou *flr*³), que apontam para mutações pontuais e alterações cromossômicas, assim como recombinação mitótica; e manchas gêmeas (células *mwh* e *flr*³ adjacentes), que são fruto exclusivo de recombinações, podendo fornecer indicações preliminares sobre a ação recombinogênica do composto (GRAF *et al.*, 1984). Logo, este ensaio permite detectar agentes causadores de mutações pontuais, alterações cromossômicas, recombinações, deleções, rearranjos, aneuploidias, entre outros.

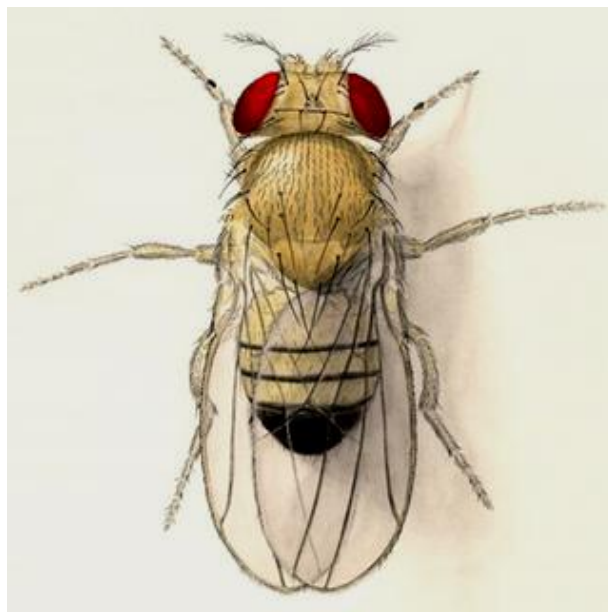


Figura 8: *Drosophila melanogaster*

Fonte: <http://www.cienciaascores.blogspot.com>

Acessado em 09/09/2010

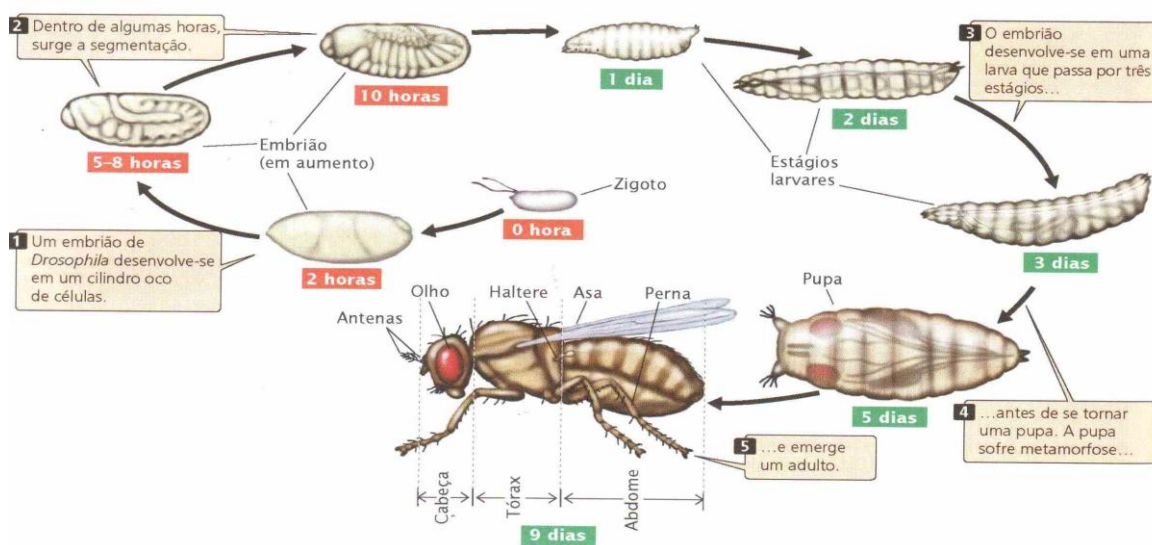


Figura 9: Ciclo de vida da *D. melanogaster*.

Fonte: Pierce, 2011

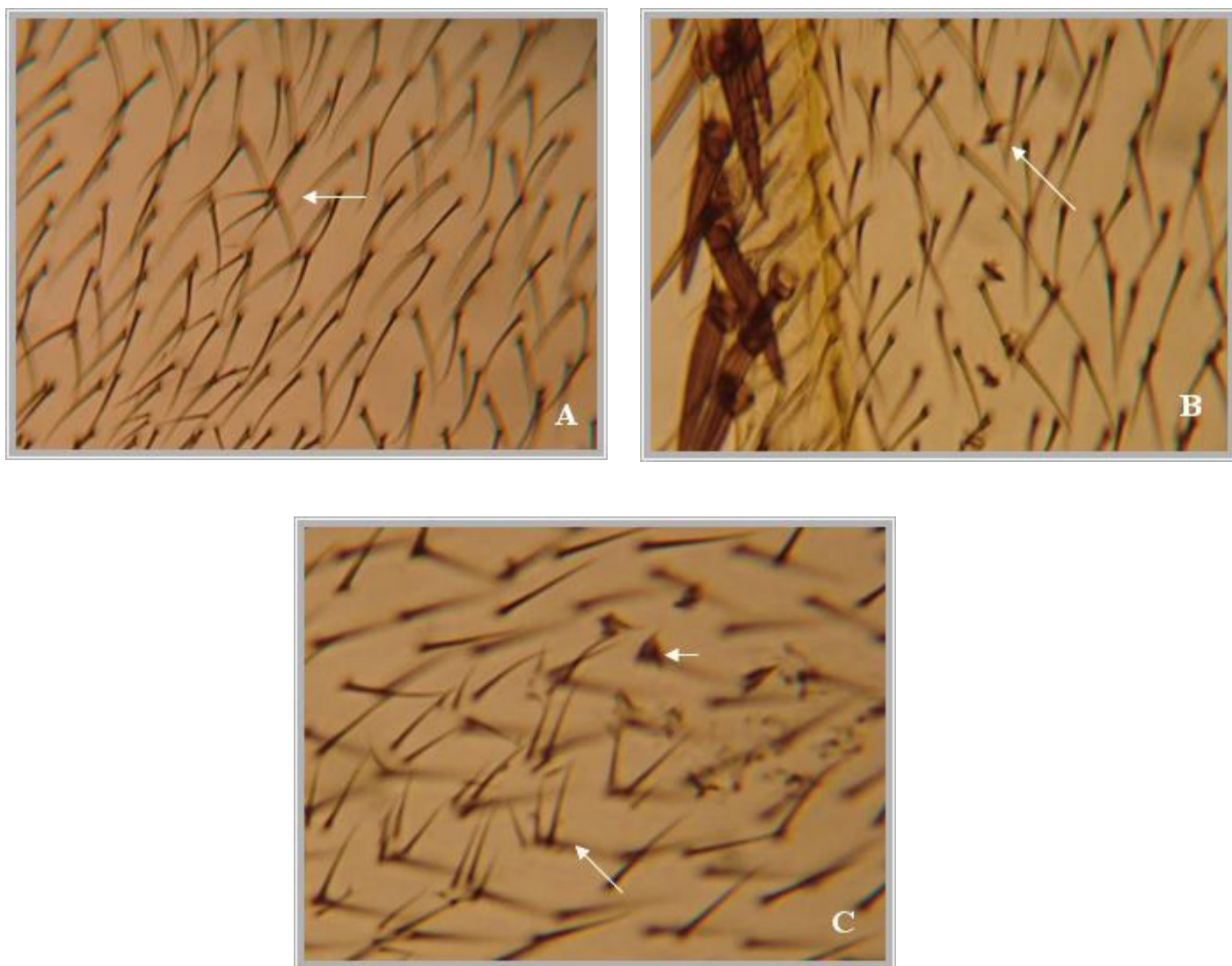


Figura 10: Fotomicrografias evidenciando os tipos de manchas mutantes encontradas. A – mancha simples com pelos múltiplos (*mwh*). B – mancha simples com pelos *flare* (*flr³*). C – Mancha gêmea, com pelos múltiplos (seta maior) e pelos *flare* (seta menor) adjacentes.

O sequenciamento do genoma da *D. melanogaster*, revelou uma alta conservação evolutiva quando comparado ao genoma humano, não apenas em nível de sequência de DNA, mas principalmente em relação às funções gênicas, demonstrando alta homologia genética. São também relevantes os dados obtidos a partir de análises do proteoma, uma vez que 60% dos 289 genes relacionados a doenças humanas apresentam homólogos em *Drosophila*, dos quais 75% portam sequências protéicas similares nestes dois organismos (TINCKOO e RUSSELL, 2002). Portanto existe uma alta conservação

entre rotas bioquímicas e funções regulatórias entre as duas espécies (ST. JOHN e XU, 1997).

Tais descobertas, somadas aos 100 anos de contribuição deste organismo à pesquisa genética, colocam a *D. melanogaster* como um modelo promissor não apenas para o estudo de doenças humanas, mas também à avaliação de substâncias que possam ser efetivamente utilizadas no seu combate (LEHMANN *et al.*, 2004; BIER, 2005, SEPEL e LORETO, 2010).

A *D. melanogaster* também é utilizada em pesquisa toxicológica (KAR *et al.*, 2001; NAZIR *et al.*, 2003; MUKHOPAHYAY *et al.*, 2003) e em experimentos de genotoxicidade (GRAF *et al.*, 1984, 1998). Além disso, o Centro Europeu para a Validação de Métodos Alternativos recomendou o uso de *D. melanogaster* em pesquisas e testes (FESTING *et al.*, 1998; BENFORD *et al.*, 2000).

Muitos compostos químicos já foram avaliados por meio do teste SMART de asa de *D. melanogaster* e dentre os compostos testados, encontram-se drogas antineoplásicas, agentes intercalantes, compostos indutores de pontes de DNA-DNA e DNA - proteína, inibidores de topoisomerasas e inibidores da síntese de DNA. Diversos pesquisadores estudaram o efeito genotóxico e/ou antigenotóxico de vários extratos de plantas, utilizando o SMART (IDAOMAR *et al.*, 2002; LAOHAVECHVANICH *et al.*, 2000; ROMERO-JIMÉNEZ *et al.*, 2005).

2.6.2 Ensaio do Cometa

Este ensaio é utilizado para preparar células em agarose e depois lisá-las, Posteriormente são expostas à microeletroforese, com objetivo de promover migração para o ânodo, devido à sua carga negativa. Assim alças de DNA danificadas migrariam, permitindo sua identificação (MARQUES *et al.*, 2003).

O Ensaio do Cometa vem sendo proposto para estudos de toxicogenética pelas suas vantagens, dentre elas: (1) apresenta sensibilidade em apontar baixo nível de danos no DNA; (2) requerimento de baixo número de células por amostras; (3) flexibilidade; (4) baixo custo; (5) fácil aplicação; (6) habilidade de conduzir estudos utilizando pequena quantidade de substância; e (7) tempo relativamente curto para a realização de experimentos (TICE *et al.*, 2000).

Este ensaio não é utilizado para detectar mutações, mas sim lesões genômicas que, após serem processadas, podem resultar em mutações. Distintas das mutações, as lesões detectadas pelo Ensaio do Cometa são passíveis de correção. O teste pode ser

também utilizado para estudos de reparo do DNA, fornecendo informações importantes sobre a cinética e o tipo de lesão reparada (SPEIT *et al.*, 1996; SPEIT e HARTMANN, 1999; TICE *et al.*, 2000).

Este ensaio é simples e pode ser executado em qualquer eucarioto, mas possui limitações. Não é um teste de mutagênese, pois o dano pode ser reparado. Por ser muito sensível deve-se ter cautela, além de um rigoroso controle para análise das conclusões, por fim o tempo decorrido entre a exposição ao mutagênico e a preparação das lâminas, até a lise, deve ser curto, em média 24 horas, pois o reparo se inicia imediatamente.

2.7 Ensaio de Citotoxicidade (MTT)

O Ensaio de Citotoxicidade (MTT) (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) é um método amplamente utilizado para a análise de viabilidade celular e proliferação de células vivas.

O princípio deste teste consiste na absorção do sal MTT pelas células vivas, sendo reduzido no interior da mitocôndria pela enzima succinato desidrogenase a um produto chamado formazan. Portanto, a reação ocorre apenas em células vivas, e o sinal gerado é dependente do nível de atividade celular. Esse método é utilizado para mensurar citotoxicidade, proliferação ou ativação celular, de forma rápida e precisa (MOSSMANN, 1983).

2.8 Cultura de Células

As pesquisas com culturas de células apresentam vantagens em relação às pesquisas realizadas em modelos animais e com seres humanos. No entanto, possui algumas desvantagens, tais como: a manutenção das culturas em condições de assepsia, a perda progressiva do grau de diferenciação das células e a incapacidade de reproduzir as condições do organismo, o que torna as respostas obtidas não totalmente representativas da situação *in vivo* (O'BRIEN *et al.*, 2000).

A maioria das linhagens celulares corresponde a células que inicialmente foram extraídas de tumores. Devido à sua capacidade proliferativa, permanece em constante divisão, o que permite a sua manutenção num sistema *in vitro*. Vários tipos celulares são extraídos para realização de experimentos *in vitro* dentre elas as células HepG2 (hepatoma humano) (Figura 11) (KNASMULER *et al.*, 1998).

Células HepG2 foram isoladas em 1979 a partir de uma hepatoblastoma primário de um menino de 11 anos. Essa linhagem celular apresenta morfologia semelhante ao

epitélio e ao parênquima hepático, além de manter a capacidade de sintetizar e secretar a maioria das proteínas plasmática características das células normais do fígado (KNASMULER *et al.*, 1998).

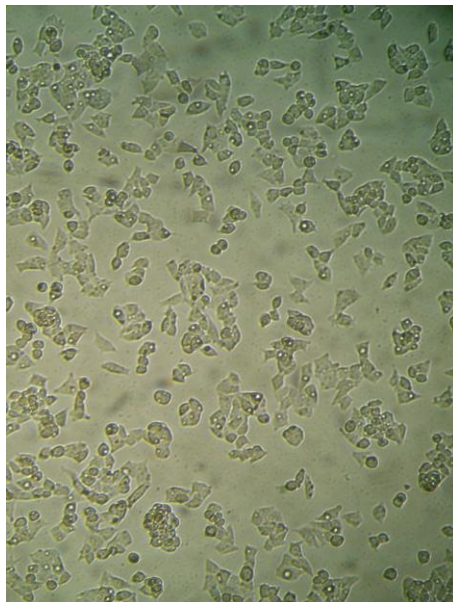


Figura 11: Fotomicrografia de células de hepatoma humano (HepG2).

O fígado é o principal órgão responsável pela detoxificação de xenobióticos, o que consiste na conversão do xenobiótico em metabólitos mais hidrossolúveis e facilmente excretados. Este tipo celular conserva as atividades das enzimas de fase I, tais como as do citocromo P450 (CYP1A1, CYP1A2, CYP2B e CYP2E1), envolvidas no metabolismo de agentes carcinogênicos. Possui também enzimas de fase II, incluindo a glutathione-S-transferase, sulfotransferases, N-acetiltransferases e glucuronosiltransferases (UHL *et al.*, 1999).

A atividade das enzimas responsáveis pela metabolização dos xenobióticos nas células HepG2 é similar ou apenas um pouco mais baixa do que a atividade das mesmas em hepatócitos humanos. Devido à competência metabólica, a linhagem celular HepG2 tem sido utilizada como modelo experimental em muitos estudos, especialmente em ensaios de toxicidade. Esta linhagem celular permite a detecção de efeitos genotóxicos no interior das células onde os metabólitos reativos formados interagem com o DNA (UHL *et al.*, 1999).

3. OBJETIVO GERAL

Diante da importância da descoberta de novas substâncias com atividades biológicas, o objetivo desta pesquisa foi avaliar os efeitos: citotóxico, genotóxico e antígeno-tóxico de extratos brutos e do alcaloide indol-monoterpênico (RC6-2) obtidos de *G. thalictroides*.

3.1. Objetivos Específicos

- ✓ Avaliar a atividade genotóxica (mutagênica e recombinogênica) dos extratos aquosos (CGQ e CGF), etanólico (BETER), clorofórmico (BGTRC-6) e do alcaloide indol-monoterpênico RC6-2, por meio do SMART.
- ✓ Verificar, por meio do ensaio SMART, a atividade antígeno-tóxica do extrato aquoso (CGQ).
- ✓ Determinar a atividade citotóxica do alcaloide indol-monoterpênico RC6-2, nas células HepG2, por meio do Ensaio de Citotoxicidade (MTT), e escolher as concentrações a serem utilizadas no Ensaio do Cometa.
- ✓ Avaliar a atividade genotóxica, nas células HepG2 tratadas com o alcaloide indol-monoterpênico RC6-2, por meio do Ensaio do Cometa.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Preparações dos Extratos e do Alcaloide Indol-monoterpênico

As raízes de *G. thalictroides* foram coletadas pelo pesquisador Airton J. S. Garcez (AGRAER-MS) no município de Bonito-MS. A identificação da espécie foi realizada pelo Prof. Dr. Arnildo Pott, sendo a exsicata 29003 (Figura 12) depositada no herbário da UFMS, localizado no Departamento de Biologia.



Figura 12: Exsicata de *Galianthe thalictroides*.

O extrato aquoso foi preparado de duas formas, utilizando-se 40mg de pó de raiz de *G. thalictroides*, dissolvido em 200ml de água, seguindo as indicações do uso popular: I) Quente (CGQ), utilizando-se água a 100°C, permanecendo em infusão até esfriar; II) Frio (CGF), o qual foi mantido em geladeira a 4°C por um período de sete dias. Estes extratos foram filtrados em papel de filtro e diluídos, imediatamente antes do uso, em água destilada estéril, obtendo-se as concentrações de 20mg/mL, 10mg/mL, 5mg/mL e 2,5mg/mL.

Do extrato etanólico BETER, a fração BGTRC-6 e o alcaloide indol-monoterpênico 1-(hidroximetil)-3-(1-hidroxi-1-metiletil)-2-(5-metoxi-9H- β -carbolin-1-il)-ciclopentanol – RC6-2, foram obtidos de acordo com metodologia descrita por Figueiredo, 2010. Estes foram, primeiramente, diluídos em 1% de *tween*-80, 3% etanol e água destilada estéril, obtendo-se as concentrações utilizadas no Ensaio SMART:

BETER (0,5; 1,0 e 2mg/mL); BGTRC-6 (0,2; 0,4; 0,8 e 1,6mg/mL) RC6-2 (0,2; 0,4; 0,8 e 1,6mg/mL).

Nos Ensaio de Citotoxicidade (MTT) e do Cometa foi testado apenas o alcaloide indol-monoterpênico (RC6-2) que foi primeiramente diluído em dimetilsulfóxido (DMSO), e em seguida em meio D-MEM (Gibco) sem soro bovino fetal onde a concentração final de DMSO não ultrapassou 1%. As concentrações testadas foram no Ensaio de Citotoxicidade (MTT) (1, 5, 10, 50 e 100µg/mL) e Ensaio do Cometa (1, 5 e 10µg/mL).

Como controle positivo em todos os testes foi utilizado Doxorubicina (DXR) (Biorrub® - Biosintética Ltda., São Paulo, Brasil - CAS n. 23214-92-8) obtido do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia - MG, (Brasil).

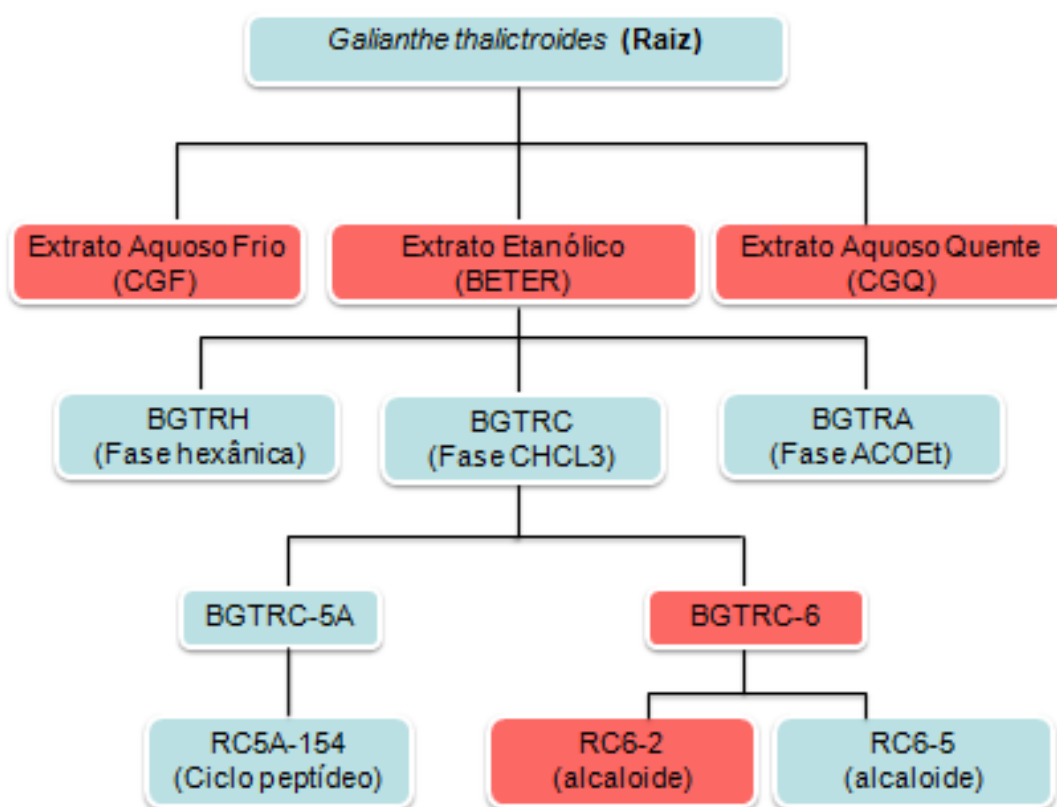


Figura 13: Esquema utilizado para estudo das raízes de *G. thalictroides*, destacadas as substâncias testadas (FIGUEIREDO, 2010).

4.2 SMART

4.2.1 Ensaio de Toxicidade das *Drosophilas*

Foi realizado o Ensaio de Toxicidade das *Drosophilas* para estabelecer as concentrações a serem utilizadas, no SMART, dos extratos aquosos (CGQ e CGF), do extrato etanólico BETER, da fração clorofórmica BGTRC-6 e do alcaloide (RC6-2). Este ensaio foi realizado de acordo com metodologia estabelecida por Rezende *et al.* (2011).

Como controle positivo foi testado as concentrações (0,125; 0,25 e 0,5mM) da Vincristina, porém todas foram tóxicas para *D. melanogaster*. Optou-se pela Doxorubicina, na concentração 0,125mg/mL (0,2mM), já estabelecida como controle positivo no SMART.

4.2.2 Estoque de *Drosophilas* e Cruzamentos

O SMART foi realizado por meio de cruzamentos experimentais utilizando-se três linhagens portadoras dos marcadores recessivos, encontrados no cromossomo 3 de células do disco imaginal de asas de *D. melanogaster*, o marcador *multiple wing hairs* (*mwh*, 3-0.3) e o *flare* (*flr*³, 3-38.8): [1] linhagem *multiple wing hairs* (*mwh*) com constituição genética *y; mwh jv*; [2] linhagem *flare-3* (*flr*³), com constituição genética *flr3 / In(3LR)TM3 ri pp sep l(3)89Aa bx34e e BdS*; [3] linhagem *ORR; flare-3* (*ORR; flare-3*), com constituição genética *ORR; flr3 / In(3LR)TM3, ri pp sep l(3)89Aa bx34e e BdS*. Esta última linhagem, possui os cromossomos 1 e 2 provenientes da linhagem Oregon R (R), resistente ao DDT), contendo genes responsáveis por alto nível de enzimas de metabolização do tipo citocromo P(CYP)6 A2 (GRAF E VAN SCHAIK, 1992).

Com estas linhagens foram realizados dois diferentes cruzamentos: 1) cruzamento padrão (ST – *standard cross*) entre machos *mwh* e fêmeas virgens *flr*³ (GRAF *et al.*, 1984); 2) cruzamento de alta bioativação (HB – *high bioactivation cross*) entre machos *mwh* e fêmeas virgens *ORR; flr*³ (GRAF e VAN SCHAIK, 1992). Ovos dos dois cruzamentos foram coletados por oito horas em frasco contendo base de ágar-ágar (4% w/v) coberta com uma camada de fermento biológico suplementado com açúcar. Larvas de terceiro estágio de desenvolvimento 72 ± 4 h foram lavadas com água corrente e coletadas com o auxílio de uma peneira de malha fina. Grupos de larvas foram transferidos para frascos de vidros contendo 1,5g de meio alternativo (purê

instantâneo de batata Yoki®) e tratado com três concentrações dos extratos (CGQ e CGF), (BETER), (BGTRC-6) e do alcaloide (RC6-2). Como controle positivo foi utilizado o DXR (0,125mg/mL) e como CN – solvente (água Milli-Q, 1% de Tween-80 e 3% etanol).

Adultos emergentes portadores dos dois tipos de genótipos: *mwh + / + flr³* ou *mwh + / + TM3, Bds*, foram coletados e fixados em etanol 70%. As asas foram montadas entre lâminas e lamínulas com solução de Faure (30g de goma arábica, 50g de hidrato de cloral, 20mL de glicerol e 50mL de H₂O) e analisadas quanto à ocorrência de diferentes tipos de manchas mutantes, em microscópio de campo claro com magnificação de 400x.

4.3 Linhagem Celular

A linhagem celular utilizada foi HepG2, cedida pelo Prof. Dr. Sigfried Knasmüller do Instituto de Pesquisa do Câncer da Universidade de Viena Áustria. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Genética Toxicológica da Universidade Estadual de Londrina (UEL). As células foram descongeladas e cultivadas em frascos de cultura de 25cm² contendo meio D-MEM suplementado com 10% de SBF, mantidas em estufa de CO₂ 5% a 37°C.

4.4 Ensaio de Citotoxicidade (MTT)

Este teste é baseado no protocolo descrito pela primeira vez por Mossmann (1983). Para tanto, foi utilizada uma placa com 24 poços onde semeou 4 x 10⁴ células em cada poço, exceto na coluna 2, onde depositou-se 0,5mL de meio de cultura. As células permaneceram em cultura por 24 horas para estabilização.

Após este período, o meio de cultura da placa foi descartado e adicionado na coluna 1 controle negativo (1% DMSO e meio de cultura D-MEM suplementado com 10% SBF), na coluna 2 branco com 0,5mL de meio de cultura D-MEM suplementado com 10% SBF. Na coluna 3, controle positivo, recebeu uma solução de DXR (10µg/mL). Os poços das colunas 4, 5 e 6 receberam três diferentes concentrações do alcaloide (RC6-2) (Tabela 1).

Após 24 horas de tratamento, o sobrenadante foi descartado e adicionado 0,5mL de MTT em cada poço. As células foram incubadas em estufa de CO₂ 5% a 37° C por 4 horas. Posteriormente foi retirado o MTT por completo dos poços, e adicionado 0,5mL de DMSO/poço para diluir os cristais formados pelo MTT no interior das mitocôndrias.

Para a leitura da absorbância em espectrofotômetro a 540nm, os grupos tratados foram transferidos para uma placa de 96 poços

Para melhor visualização dos dados, as absorbâncias foram transformadas em porcentagem de sobrevivência celular pela fórmula:

$$\% \text{ Sobrevivência} = \frac{\text{A testado} - \text{A branco}}{\text{A controle} - \text{A branco}} \times 100$$

A = Absorbância

Tabela 1. Esquema da placa usada para o teste de Citotoxicidade (MTT)

	1	2	3	4	5	6
A	CN	B	DXR	A1	A2	A3
B	CN	B	DXR	A1	A2	A3
C	CN	B	DXR	A1	A2	A3
D	CN	B	DXR	A1	A2	A3

C – Controle negativo

B – Controle sem células

DXR – Doxorubicina

A1 a A3 – Concentrações testadas do alcaloide (RC6-2)

4.5 Ensaio do Cometa

Em frascos de 25cm² foram semeadas 1x10⁶ células HepG2 com 5mL de meio de cultura D-MEM suplementado com 10% de SBF.

Após 24 horas, o meio de cultura foi descartado e adicionado novo meio de cultura com os tratamentos, permanecendo em cultura por 3 horas. Depois desse período foi realizada a coleta, pelo seguinte protocolo: Descartou-se o meio de cultura; lavou-se as células duas vezes com 2,5mL de solução tampão salina fosfato (PBS) em temperatura ambiente e desprezou-se o excesso com pipeta *Pasteur*; adicionou-se 200µL de tripsina 0,01%; inativou-se com 0,5mL de meio de cultura; centrifugou-se em 1250rpm por 5 minutos e desprezou-se o sobrenadante deixando cerca de 0,5mL de meio de cultura; em microtubo colocou-se 20µL de suspensão celular com 120µL de agarose de baixo ponto de fusão (37°C); homogenizou-se e depositou-se em uma lâmina pré-gelatinizada com agarose e cobrir com uma lamínula limpa; aguardou-se 20 minutos

com a lâmina na geladeira; removeu-se a lamínula e encaminhou a lâmina para uma solução de lise gelada, composta por 1mL de Triton X-100, 10mL de DMSO e 89mL de solução estoque (2,5M NaCl; 100mM EDTA; 10mM Tris; 8,0g NaOH para corrigir o pH 10; 890mL de água destilada), por uma hora e meia; realizar eletroforese a 25V 300mA em fase escura (solução de eletroforese: 300mM e 1mM EDTA, pH 13, preparada a partir da solução estoque: NaOH 10N e EDTA 200mM- pH 10); procedeu-se a desnaturação por 30 minutos e corrida da eletroforese por 20 minutos; neutralizou-se as lâminas por 15 minutos; secou-se a temperatura ambiente e fixou-se em etanol absoluto por 10 minutos; corou-se a lâmina com brometo de etídio 0,002mg/mL e analisou-se 100 células por tratamento em microscópio de fluorescência classificando os cometas em classe 0, 1, 2 e 3 (Figura 14).

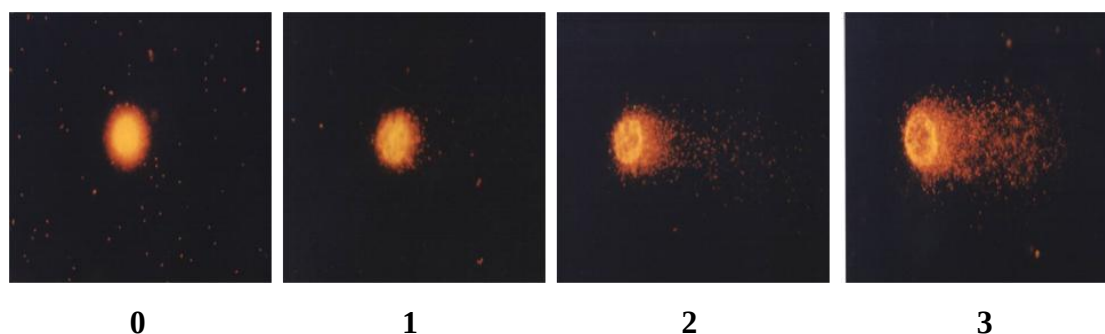


Figura 14: Critério de classificação para análise do Ensaio do Cometa. Coloração: Brometo de Etídeo. Microscopia de fluorescência, objetiva 40X.

4.6 Análises Estatísticas

Os níveis de significância dos resultados obtidos através do SMART, Ensaio de Citotoxicidade (MTT) e Ensaio do Cometa, foram determinados utilizando o Teste ANOVA-Dunett, comparando-se os tratamentos dos extratos aquosos, etanólico, clorofórmico e do alcaloide, com o controle negativo. Foi considerado estatisticamente significativo $*p < 0,05$ e $**p < 0,01$.

O Ensaio de toxicidade em *Drosophila melanogaster* foi determinado através do teste de χ^2 , as diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $*p < 0,05$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 SMART

A tabela 2 (Apêndice) apresenta os resultados obtidos com o Ensaio de Toxicidade das *Drosophilas* e verificou-se que a fração BETER na concentração de 4mg/mL e a fração BGTRC-6, na concentração de 1,6mg/mL foram tóxicas, pois ocasionaram uma redução significativa ($p < 0,05$) da sobrevivência de moscas adultas.

A tabela 3 (Apêndice) apresenta as frequências de manchas mutantes obtidas nos descendentes do cruzamento ST, tratados cronicamente com os extratos CGQ e CGF, assim como os controles, negativo e positivo. A forma de preparo do extrato (quente ou frio), nas diferentes concentrações não induziu aumentos estatisticamente significativos ($p > 0,05$) nas frequências de manchas por indivíduos, quando comparado com o controle negativo (Figura 15). Estes resultados indicam que nas concentrações avaliadas, os extratos não são genotóxicos.

Analisando-se os dados obtidos com os tratamentos realizados com os descendentes HB (Figura 15 e tabela 4 - Apêndice), verifica-se que as frequências de manchas mutantes obtidas nos grupos tratados, não diferem estatisticamente das encontradas no controle negativo. Estes resultados indicam que as formas de preparo dos extratos (CGQ e CGF), bem como as concentrações utilizadas, não ocasionaram eventos genotóxicos, pois o número de mutações expressas nos grupos tratados, não difere significativamente das obtidas no controle negativo.

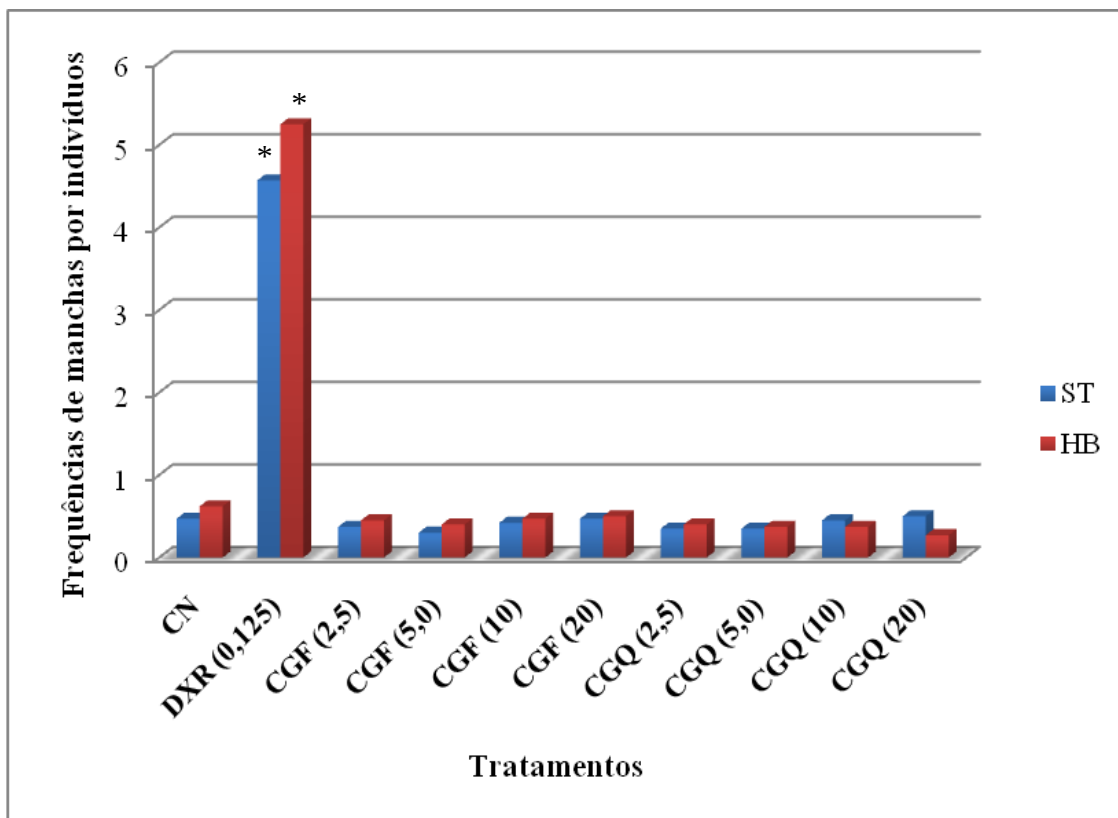


Figura 15: Gráfico das frequências de manchas mutantes por indivíduos do cruzamento padrão (ST) e de alta biativção (HB) após tratamento com CGF e CGQ. Diferença significativa em relação ao Controle Negativo (CN) * $p < 0,05$.

Como o modo de preparo dos extratos não interferiu nos resultados de genotoxicidade, optou-se por avaliar a possível ação antigenotóxica, somente com o extrato preparado a 100°C (CGQ). Os resultados dos descendentes dos cruzamentos ST e HB estão expressos na tabela 5 (Apêndice) e verifica-se que os descendentes ST tratados simultaneamente com CGQ e DXR apresentam frequências de manchas simples pequena, simples grandes e gêmeas, que não diferem significativamente das obtidas no controle positivo (DXR) (Figura 16). Resultado similar foi obtido com os descendentes HB e, portanto, os dados indicam que o CGQ não apresenta atividade antigenotóxica, pois não protegeu o DNA dos eventos de mutação e recombinação ocasionados pela DXR em células somáticas de *D. melanogaster*. Não são descritas na literatura as atividades antigenotóxica para extratos aquosos obtidos de plantas da família Rubiaceae, entretanto são descritas diversas ações biológicas, como, por exemplo, atividades contra a malária de extratos de *Cinchona pubescens* Vahl (COELHO *et al.*, 2006).

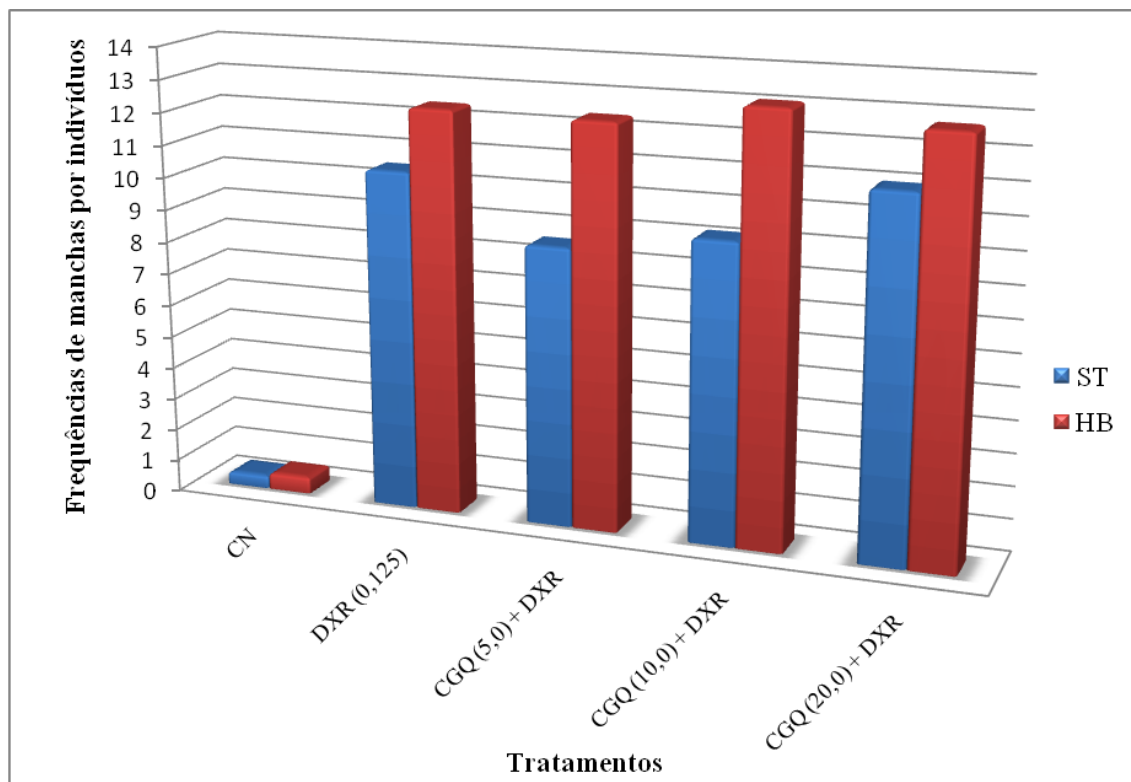


Figura 16: Gráfico das frequências de manchas mutantes por indivíduo resultantes dos cruzamentos ST (padrão) e de alta bioativação (HB) após tratamento com CGQ associado à DXR.

A tabela 6 (Apêndice) e a figura 17 apresentaram as frequências de mutações por indivíduo, observadas nos descendentes ST e HB tratados com a fração BETER. Verifica-se que os descendentes ST apresentam frequências de manchas mutantes que variam de 0,22 a 0,37, similares às observadas no controle negativo 0,47. Apesar dos grupos tratados apresentarem frequências de mutação menores do que as observadas no controle negativo, estes resultados não são significativos. Entretanto, nos descendentes HB verifica-se que as frequências de mutação variam de 0,92 a 1,05, que são valores estatisticamente diferentes dos observados no controle negativo 0,62.

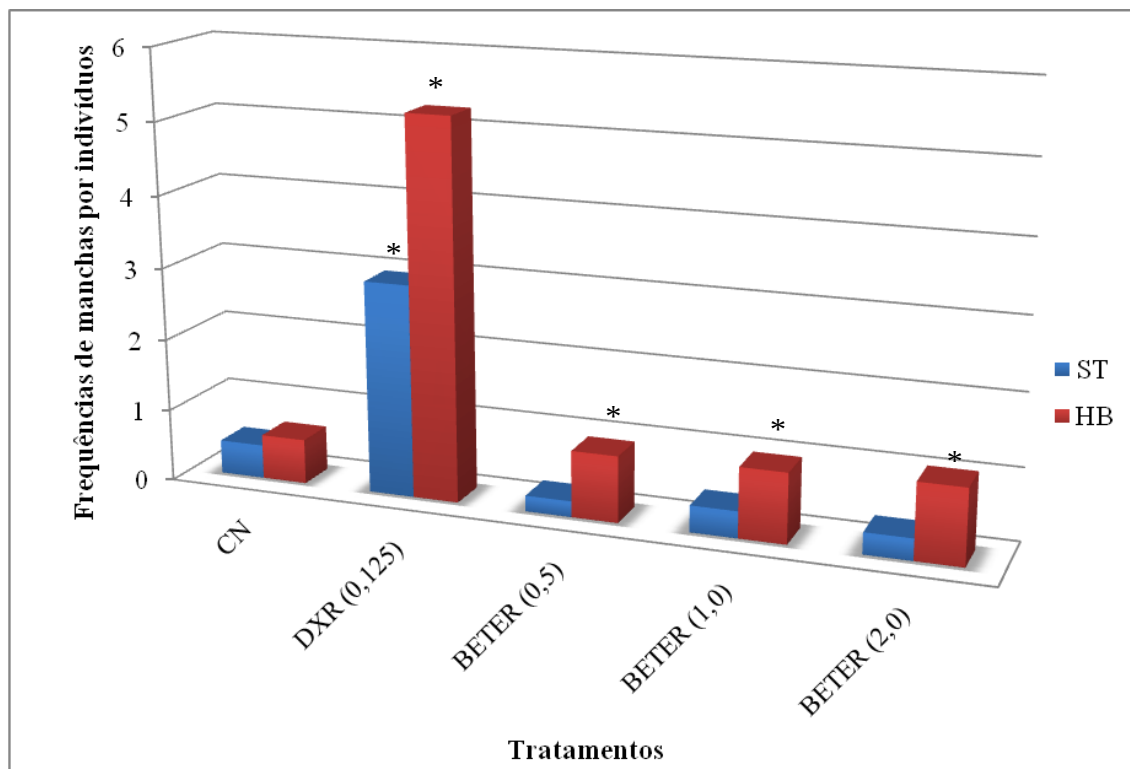


Figura 17: Gráfico das frequências de manchas mutantes por indivíduos dos cruzamentos padrão (ST) e de alta bioativação (HB) após tratamento com BETER. Diferença significativa em relação ao Controle Negativo (CN) * $p < 0,05$.

Estes resultados indicam que a fração etanólica (BETER), uma vez metabolizada, apresenta potencial genotóxico, dose resposta. A diferença de resposta observada para os descendentes das linhagens ST e HB deve-se aos altos níveis de citocromo P-450, enzimas de metabolização de xenobióticos, presentes na linhagem HB, o que torna estes indivíduos mais sensíveis na detecção de promutágenos e procarcinogênicos (GRAF e SINGER, 1992; GRAF e VAN SCHAIK, 1992).

A ação genotóxica do extrato etanólico deve-se provavelmente aos constituintes encontrados no extrato, de acordo com Figueiredo (2010), este extrato apresenta taninos condensados e alcaloide indol-monoterpênico. Os taninos exibem diversas atividades biológicas, tais como bactericida, antiviral, agente modulador e antitumoral (DE BRUYNE *et al.* 1999; OKUDA, 2005). Entretanto, os taninos podem apresentar efeitos tóxicos e genotóxicos, causando quebras de fita simples, e duplas no DNA, além de gerar sítios álcali lábeis e oxidação de purinas e pirimidinas (MBA *et al.*, 1999).

Diversas plantas utilizadas pela medicina popular podem apresentar propriedades farmacológicas e, simultaneamente, causar alterações no DNA, tais como

as mutações (MARQUES *et al.*, 2003). A literatura especializada relata que mutações gênicas atuam em etapas iniciais da carcinogênese.

Ensaio que detectam componentes genotóxicos permitem identificar substâncias com potencial risco à saúde humana. Entretanto, metabólitos secundários obtidos de plantas com atividade genotóxica, tais como os alcaloides campoptecina, vincristina e vimblastina e o diterpeno taxol, podem ser utilizados como quimioterápico, no tratamento de vários tipos de câncer (RASKIN *et al.*, 2002).

A tabela 7 (Apêndice) apresenta as frequências de mutações obtidas nos descendentes *mwh/flr³* resultante do cruzamento HB, tratados com a fração (BGTRC-6). Verifica-se que as concentrações de 0,4 e 0,8mg/mL aumentaram a frequência de manchas simples pequenas, estatisticamente diferente das observadas no controle negativo. Entretanto, a concentração de 1,6mg/mL foi citotóxica. Estes dados estão de acordo com os resultados obtidos por Figueiredo (2010), onde a fração (BGTRC-6) apresentou citotoxicidade elevada frente a duas linhagens de células tumorais de melanoma murino (B16-F10) e mama humana (MCF-7), com IC50 menor do que o observado para cisplatina; A fração BGTRC-6 também foi ativa contra a linhagem celular de carcinoma de laringe (HEp-2).

Com o objetivo de calcular a frequência de recombinação ocasionada pela fração BGTRC-6, nas concentrações de 0,4 e 0,8mg/mL, foram analisados os descendentes *mwh/TM3*, os quais detectam somente eventos de mutação. Verificou-se que esta fração também ocasiona eventos mutagênicos, expressos pelo aumento de manchas simples pequenas, diferente das observadas no controle negativo (Figura 18). Calculando-se a frequência de recombinação, observa-se que os eventos recombinogênicos correspondem a 46% e 50% das mutações observadas. Portanto, esta fração tem metabólitos que ocasionam eventos mutagênicos e recombinogênicos. Eventos recombinogênicos estão diretamente ligados com metabólitos que atuam como agentes intercalantes ou inibidores de topoisomerase (GUTERRES, 2008).

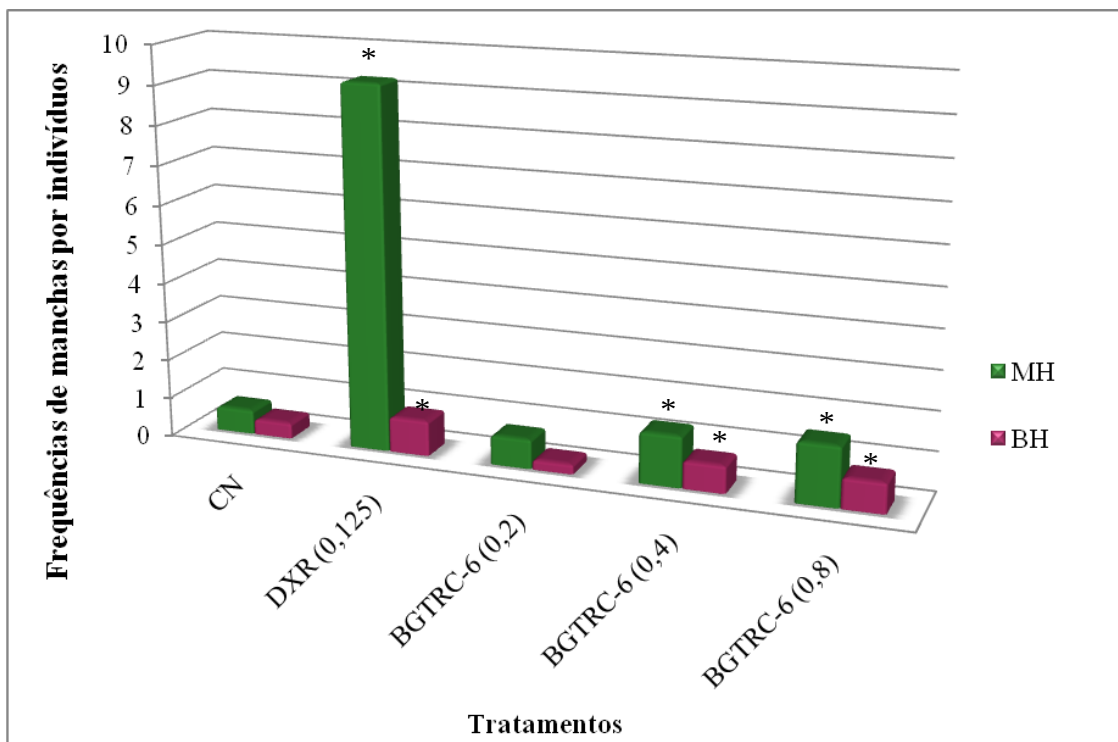


Figura 18: Gráfico das frequências de manchas mutantes do cruzamento de alta bioativação (HB) dos descendentes heterozigotos balanceados (BH – *mwh/TM3*) e dos descendentes trans-heterozigotos marcados (MH – *mwh/flr³*) após tratamento com BGTRC-6. Diferença significativa em relação ao Controle Negativo (CN) * $p < 0,05$.

A tabela 8 (Apêndice) e a figura 19 apresentam os resultados obtidos com o alcaloide indol-monoterpênico (RC6-2). A análise dos descendentes *mwh/flr³* mostrou que as diferentes concentrações induziram aumentos estatisticamente significativos nas frequências de manchas mutantes, variando de 0,80 a 1,72 quando comparadas com as observadas no controle negativo 0,65. Verifica-se que a resposta foi dose dependente, e que há uma prevalência de manchas simples pequenas. De acordo com Graf *et al.* (1984) manchas simples pequenas são originadas por mutações cromossômicas (aneuploidia) e/ou grandes deleções, independente do tempo em que elas foram induzidas, já que essas células apresentam uma baixa taxa de divisão celular.

Observa-se que os descendentes *mwh/TM3* apresentam frequências de mutação semelhante às encontradas nos descendentes *mwh/flr³*, variando de 0,65 a 2,10, enquanto que a frequência no controle negativo foi de 0,4. O cálculo de recombinação indica que este alcaloide não exerce atividade recombinogênica. Portanto as mutações observadas devem-se, exclusivamente à atividade mutagênica. As frequências de manchas mutantes encontradas com o RC6-2 nos descendentes *mwh/flr³* e *mwh/TM3* são similares às obtidas por Tiburi *et al.* (2002) para a vincristina.

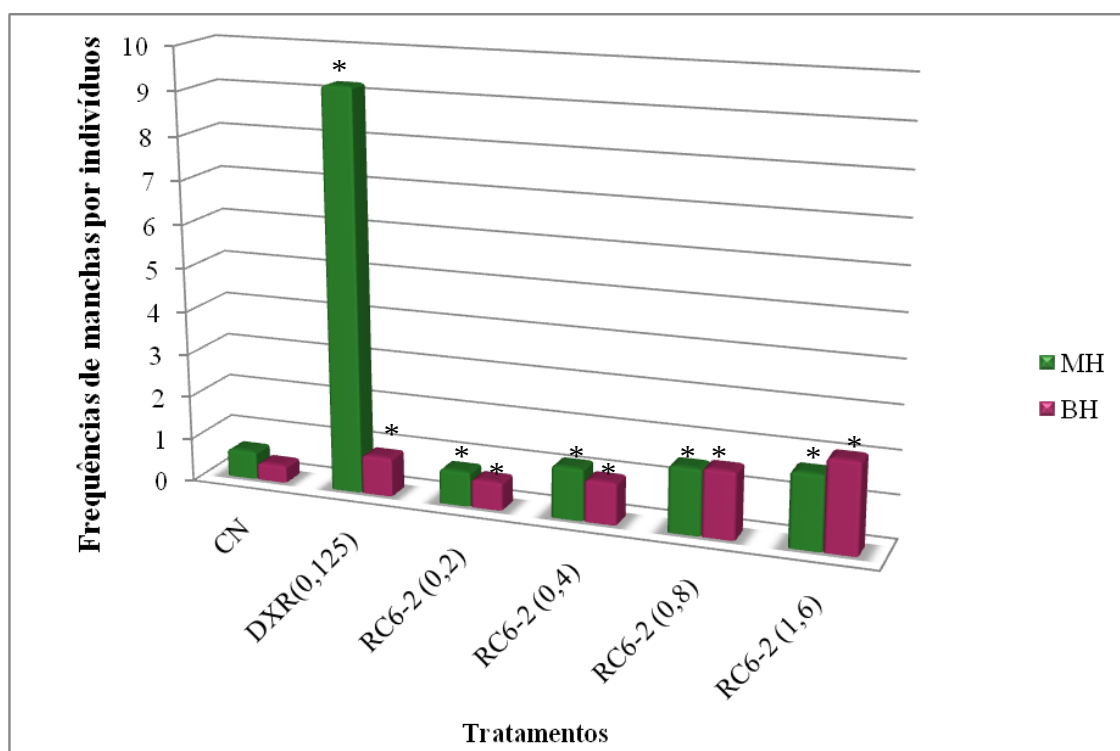


Figura 19: Gráfico das frequências de manchas mutantes por indivíduos do cruzamento de alta bioativação (HB), dos descendentes heterozigotos balanceados (BH - *mwh/TM3*) e dos descendentes trans-heterozigotos marcados (MH - *mwh/flr³*), após tratamento com RC6-2. Diferença significativa em relação ao Controle Negativo (CN) * $p < 0,05$.

O alcaloide RC6-2 foi obtido a partir da fração BGTRC-6. No entanto, comparando-se os dados obtidos com o ensaio SMART, verifica-se que a fração BGTRC-6 foi citotóxica na concentração de 1,6mg/mL, fato que não aconteceu com o alcaloide. Esta diferença de citotoxicidade deve ser atribuída a outros metabólitos presentes na fração BGTRC-6. A diferença de citotoxicidade entre BGTRC-6 e RC6-2 também foi observada frente à linhagem celular B16-F10 (FIGUEIREDO, 2010).

Observou-se que a fração BGTRC-6 induziu 50% de eventos de recombinação, fato que não foi verificado com o RC6-2. Quando diferentes alcaloides indol-monoterpênico, vincristina e vimblastina, foram avaliados por meio do SMART, observou-se atividade genotóxica e não recombinogênica (TIBURI *et al.*, 2002).

Alcaloides como vincristina e vimblastina são antimitóticos e esta propriedade foi confirmada em ensaios *in vitro* em culturas de fibroblastos de pulmão de *hamster* (sub-clone V79-MZ) e de medula óssea e de eritrócitos de *hamster* (GUDI *et al.*, 1990; ANTOCCIA *et al.*, 1991).

De acordo com Rang *et al.* (2009) a ação mais provável está relacionada com a inibição da formação de microtúbulos no fuso mitótico, pela ligação da vincristina especificamente à tubulina e bloqueio da capacidade desta proteína de se polimerizar em microtúbulos, resultando em parada da divisão celular na metáfase. Na ausência de um fuso mitótico, os cromossomos podem se dispersar por todo o citoplasma (mitose expandida), ou podem se aglomerar em grupos inusitados, como bolas ou estrelas.

A incapacidade de segregação correta dos cromossomos durante a mitose presumivelmente leva à morte celular. Tanto as células normais quanto as malignas expostas à vincristina sofrem alterações características do processo de apoptose. Acredita-se que os efeitos antitumorais da vincristina dependem principalmente da interferência com a função normal dos microtúbulos e o bloqueio da progressão do ciclo celular na fase G2 – M. Além desse efeito, o fármaco possui outras implicações bioquímicas tais como inibição da síntese de proteínas e ácidos nucleicos, e alteração do metabolismo lipídico (SUI e FAN, 2005).

De acordo com Deene e Hussain (1991), alcaloides do gênero *Nauclea* (Rubiaceae), os quais são formados principalmente por indol e seus derivados glicosilados, podem ser os responsáveis por várias atividades biológicas, incluindo atividade antimalária. Os alcaloides indol-monoterpênicos tem potencial no tratamento de malária, doenças infecciosas e câncer (FRÉDÉRICH *et al.*, 2003; PHILIPPE *et al.*, 2006, 2007).

5.2 Ensaio de Citotoxicidade (MTT) e Ensaio do Cometa

A tabela 9 (Apêndice) apresenta os resultados de citotoxicidade do alcaloide RC6-2 em células HepG2. Os resultados obtidos indicam que as concentrações (1 e 5 µg/mL) apresentaram absorbâncias médias equivalente à obtida no controle negativo (CN), ou seja, não foram citotóxicas para as células. Entretanto, as concentrações (10, 50 e 100 µg/mL) apresentaram absorbâncias médias inferiores à do CN, apresentando atividade citotóxica (Figura 20). Os resultados encontrados no Ensaio de Citotoxicidade (MTT) com células HepG2 estão de acordo como os obtidos com o Ensaio de Citotoxicidade (Sulforrodamina B), pois o RC6-2 apresentou potente atividade citotóxica frente às linhagens de células tumorais (OVCAR, B16-F10, MCF-7, 786-0 e UACC62), (FIGUEIREDO, 2010).

Compostos citotóxicos são conhecidos como agentes tóxicos que, além de seu efeito citostático, tem graves efeitos adversos, como por exemplo, a genotoxicidade (DHAWAN *et al.*, 2003). Efeitos genotóxicos podem ser analisados por meio de vários sistemas testes, dentre eles, o Ensaio do Cometa. Este teste tem se mostrado bastante sensível para detectar danos primários no DNA de células individualizadas, passíveis de reparo pela expressão dos genes envolvidos neste mecanismo (TICE *et al.*, 2000).

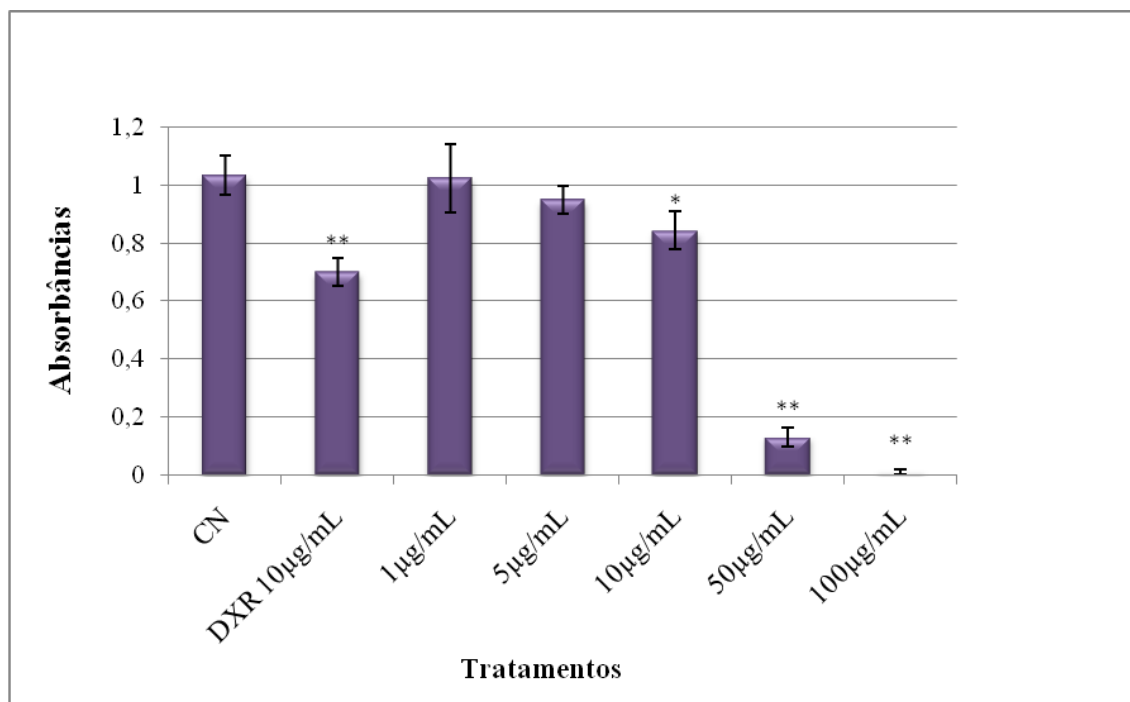


Figura 20: Gráfico da absorbância média observada no Ensaio de Citotoxicidade (MTT) após tratamento de 24 horas com o alcaloide (RC6-2). Diferença significativa em relação ao Controle Negativo (CN), * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Para o Ensaio do Cometa foram usadas as concentrações não citotóxicas (1 e 5µg/mL) e citotóxica (10µg/mL) do alcaloide RC6-2 (tabela 10 – Apêndice). Verificou-se que as concentrações testadas não foram genotóxicas, pois não ocasionaram quebras de fitas de DNA, não apresentando diferença significativa quando comparadas ao grupo controle (Figura 21).

Há poucos relatos na literatura sobre atividade genotóxica de extratos aquosos e de metabólitos secundários obtidos de plantas da família Rubiaceae, especialmente as do gênero *Galianthe*. *Uncaria* é o gênero mais estudado, com destaque para a planta *Uncaria tomentosa*. Extratos aquosos desta planta não apresentaram atividade citotóxica em células de ovário de hamster chinês (SANTA MARIA *et al.*, 1997). A fração acetato de etila obtida de *Uncaria tomentosa* (Rubiaceae) induziu apoptose em (HL-60)

linhagem de células leucêmicas humanas (CHENG *et al.*, 2007). Extratos etanólicos obtidos das folhas de *Pavetta crassipes* (Rubiaceae) exibiram atividade antiprotozoal, antimicrobiana e antitumoral. A fração alcaloídica obtida desta planta apresentou atividade antiproliferativa em todas as linhagens de carcinomas estudados (U373, PC3, MXT e A549) e com as linhagens de células normais (NHDF e MRC-5) (BALDÉA *et al.*, 2010).

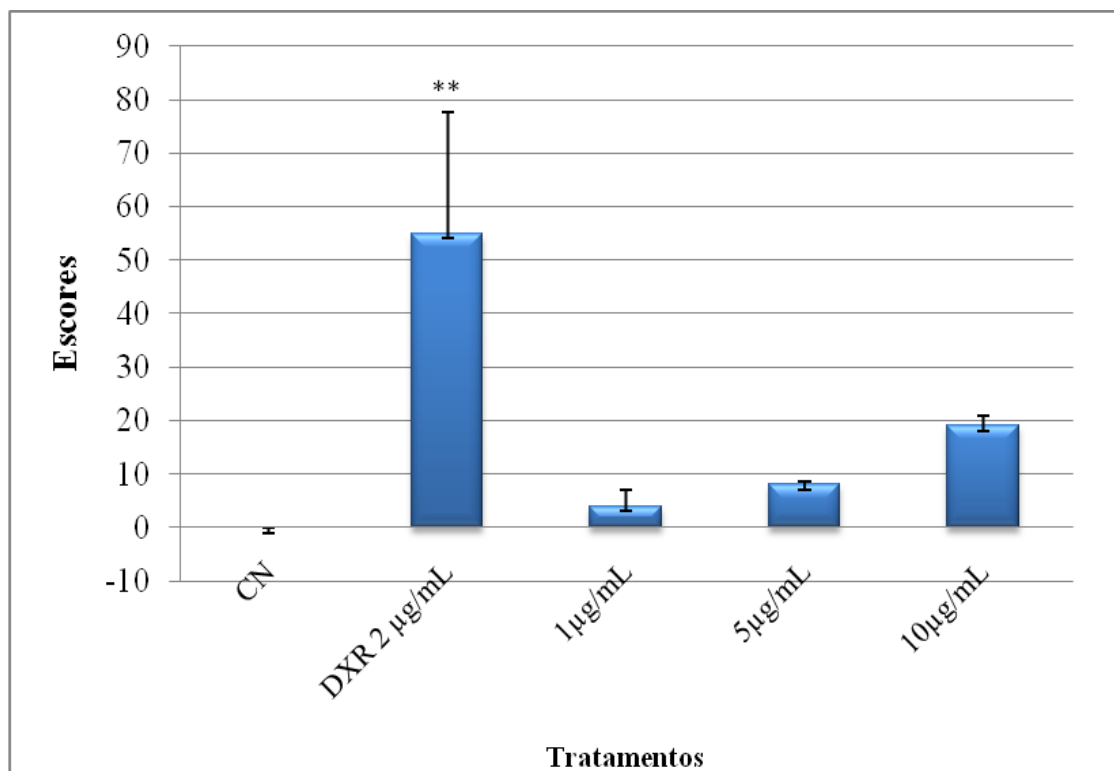


Figura 21: Gráfico do escore de danos observado em HepG2, após tratamento de 3 horas com o alcaloide RC6-2. Diferença significativa em relação ao Controle Negativo (CN), ** $p < 0,01$.

Muitos alcaloides são reconhecidos por sua genotoxicidade. Porém muitos deles já demonstraram um potencial farmacológico elevado, apresentando atividade antimicrobiana, antiplasmodial e antitumoral (FREDERICH *et al.*, 1999; ANSAH *et al.*, 2005).

Os resultados obtidos com o teste SMART, somados aos encontrados no Ensaio Cometa, sugerem que o alcaloide (RC6-2) seja um inibidor do fuso mitótico, ocasionando aneugênese, uma vez que, apresentou potente atividade citotóxica frente à linhagem de células tumorais de hepatoma humano (HepG2) e não causou recombinação mitótica e sim atividade mutagênica em células somáticas de *Drosophila melanogaster*.

6. CONCLUSÕES

Por meio do teste SMART, investigou-se a possível atividade genotóxica de extratos aquosos (CGQ e CGF) de raízes de *G. thalictroides*, os resultados obtidos indicam que estes extratos não apresentam atividade genotóxica.

O extrato aquoso CGQ também não apresentou atividade antigenotóxica.

A fração etanólica (BETER), uma vez metabolizada, apresenta potencial genotóxica.

A fração clorofórmica (BGTRC-6) foi tóxica na maior concentração testada, enquanto as demais concentrações ocasionaram eventos mutagênicos, expressos pelo aumento de manchas simples pequenas.

O alcaloide indol-monoterpênico (RC6-2), apresentou eventos mutacionais significativos, mas não recombinogênicos.

No Ensaio de Citotoxicidade (MTT) indicou que o alcaloide indol-monoterpênico (RC6-2) apresentou citotoxicidade elevada nas maiores concentrações.

No Ensaio do Cometa o alcaloide indol- monoterpênico (RC6-2) não apresentou atividade genotóxica.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aerts TJ, Barry TN, McNabb WC. Polyphenols and Agriculture: beneficial effects of proanthocyanidins in forages. *Agriculture Ecosystems And Environment* 1999; V75 P1-12.

Altmann KH, Gertsch J. Anticancer drugs from nature - natural products as a unique source of new microtubule-stabilizing agents. *Natural Product Reports* 2007; 24(2):327-57.

Ames BN. Dietary carcinogens and anticarcinogens oxygen radicals and degenerative diseases. *Science* 1983; vol 221 n 4617 p 1256-1264.

Ansah C, Khan A, Gooderham NJ. In vitro genotoxicity of the west african anti-malarial herbal *Cryptolepis sanguinolenta* and its major alkaloid cryptolepine. *Toxicology* 2005; 208:141-7.

Ansari JA e Inamdar NN. The promise of traditional medicines. *International Journal of Pharmacology* 2010; 6 (6): 8080-812.

Antoccia A, Degrossi F, Batistone A, Ciliutti P, Tanzarella C. In vitro micronucleus assay with kinetochore staining: evaluation of test performance. *Mutagenesis* 1991; 6 (4) 319-324.

Baldéa ES, Véronique M, Mohamed ST, Paul CLM, Christine D, Luc P, Aliou MB. In vitro antiprotozoal, antimicrobial and antitumor activity of *Pavetta crassipes* K. Schum leaf extracts. *Journal of Ethnopharmacology* 2010; 130 529-535.

Barros MP, Santin SMO, Souza MC, Costa WF, Vidotti GJ, Souza MC, Bersani-Amado CA, Sarragiotto MH. In: Oliveira PRN De, Testa G, Sena SB, Da Costa WF, Sarragiotto MH, Santin SMO. Saponinas Triterpênicas Das Raízes De *Guettarda Pohliana* Müll. Arg. (Rubiaceae). *Química. Nova*, 2008; Vol.31, No. 4, P.755-758.

Basso LA, Silva LHP, Fett-Neto AG, Junior WFA, Moreira IS, Palma MS, Calixto JB, Filho SA, Santos RR, Soares MBP, Santos DS. The use of biodiversity as source of new chemical entities against defined molecular targets for treatment of malaria, tuberculosis, and t-cell mediated diseases – A Review. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz* 2005; V. 100, N. 6, P. 575-606.

Benford DJ, Hanley BA, Bottrill K, Oehlschlager S, Balls M, Branca F, Castengnaro JJ, Descotes J, Hemminiki K, Lindsay D, Schitter B. Biomarkers as predictive tools in toxicity testing. *Alternernative to Laboratory Animals* 2000; 28: 119-131.

Bier E. *Drosophila*, the golden bug, emerges as a tool for human genetics. *Nature* 2005; 9: 9-22.

Bolzani VS, Young CM, Furlan M, Cavaleheiro AJ, Araújo AR, Silva DHS, Lopes MN. Secondary metabolites from brazilian rubiaceae plant species: chemotaxonomical and biological significance. *Recent Resesearch Development in Phytochemistry* 2001; 5: 19-31.

Cabral EL. Revisión del género *Galianthe* (Rubiaceae-Spermacoceae). 52º Congresso Nacional De Botânica 2001; João Pessoa, Brasil. 22-27 VIII.

Carvalho JE, Foglio MA. Constituintes químicos de *Galianthe Brasiliensis* (Rubiaceae). *Química Nova* 2006; Vol. 29, No. 3, 452-455.

Capasso A, Balderrama L, Sivila SC, Tommasi ND, Sorrentino L, Pizza C. Phytochemical and pharmacological studies of *Guettarda acreana*. *Planta-Medica* 1998; 64(4): 348-52.

Cheng-an-chin, Cheng-bang jian, Yu-ting huang, Ching-shu lai, Ping-chi hsu, Min-hsiung pan. Induction of apoptosis by *Uncaria tomentosa* through reactive oxygen species production cytochrome c release and caspases activation in human leukemia cells. *Food and Chemical Toxicology* 2007; 45 2206–2218.

Coelho VPM, Agra MF, Barbosa MRV. Estudo Farmacobotânico das folhas de *Tocoyena formosa* (Cham. & Schltdl.) K. Schum. (Rubiaceae). *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 2006; 16(2): 170-177.

Cordell GA, Quinn-Beattie ML, Farnsworth NR. The potential of alkaloids in drug discovery. *Phytotherapy Research* 2001; 15(3): 183–205.

Croteau R, Kutchan TM, Lewis NG. Natural products (secondary metabolites). In: Buchanan, B., W. Gruissem, R. Jones (Eds). *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. 1ª Ed. Rockville: American Society Of Plant Biologists 2000; P. 1250-1318.

De Bruyne T, Pieters L, Deelstra H, Vlietinck A. Condensed vegetable tannins: biodiversity in structure and biological activities, biochemical systematic. *Ecology* 1999; 27 445–459.

Deeni YY, Hussain HSN. Screening for antimicrobial activity and for alkaloids of *Nauclea latifolia*. *Journal of Ethnopharmacology* 1991; 35, 91–96.

De Flora S. Mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. *Mutation Research* 1998; V. 402, P.151-158.

De Flora S, Ramel, C. Mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. classification and overview. *Mutation Research* 2001; 202: 285-306.

Dhawan A, Kayani MA, Parry JM, Parry E, Anderson D. Aneugenic and clastogenic effects of doxorubicin in human lymphocytes. *Mutagenesis* 2003; 18, 487–490.

Elisabetsky E. Etnofarmacologia de algumas tribos brasileiras. In: Ribeiro, Darcy (Ed.) *Suma Etnológica Brasileira*. Petrópolis, Rio de Janeiro. Etnobiologia 1997; Vozes V.1.

Elvin-Lewis M. Should we be concerned about herbal remedies? *Journal Of Ethnopharmacology* 2001; V. 75, P. 141–164.

Festing MFW, Baumans V, Combes DR, Hadler M, Hendriksen FM, Howards BR, Lovell DP, Moore GJ, Overend P, Wilson MS. Reducing the use of laboratory animals in biomedical research: problems and possible solutions. *Alternative to Laboratory Animals* 1998; 26: 283-301.

Frei H, Würigler FE. Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative, or inconclusive result. *Mutation Research* 1988; 203: 297-308.

Frédérich M, Bentires-Alj M, Tits M, Angenot L, Greimers R, Gielen J, Bours V, Merville MP. Isostrychnopentamine, an indolomonoterpenic alkaloid from *strychnos usambarensis*, induces cell cycle arrest and apoptosis in human colon cancer cells. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 2003; 304,1103–1110.

Frederich M, Hayette MP, Tits M, De Mol P, Angenot L. In vitro activities of *Strychnos* alkaloids and extracts against *Plasmodium Falciparum*. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43:2328-31.

Figueiredo PO De. Estudo químico das raízes de *Galianthe thalictroides* (rubiacaceae) guiado pela atividade citotóxica *in vitro* frente a linhagens de células tumorais. (Dissertação de Mestrado) Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Campo Grande MS 2010.

Graf U, Van Schaik N. Improved high bioactivation cross for the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research* 1992; 271, P.59-67.

Graf U, Abraham SK, Guzman-Rincon J, Würgler FE. Antigenotoxicity studies in *Drosophila Melanogaster*. *Mutation Research* 1998; 402: 203-209.

Graf U, Würgler FE, Katz AJ, Frei H, Juon H, Hall CB, Kale PG. Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environmental and Mutagenesis* 1984; 6:153-188.

Graf U, Singer D. Genotoxicidade testing of promutagens in the wing somatic mutationd and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Revista internacional de contaminación ambiental* 1992; 8(1): 15-27.

Gudi R, Sandhu SS, Athwal RS. Kinetochore identification in micronuclei in mouse bone marrow erythrocytes: an assay for detection of aneuploidy-inducing agents. *Mutation Research* 1990; 234 (5), 263-268.

Guterres ZR. Investigação das atividades mutagênica, antimutagênica e antioxidante de extratos etanólicos de *Aiouea Trinervis*, *Nectandra Cissiflora*, *Ocotea Minarum* (Lauraceae) e dos alcaloides triptofol, ocoteína e dicetrina. (Dissertação De Mestrado) Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Uberlândia MG; 2008.

Hsu YL, Kuo PL, Lin CC. Proliferative inhibition, cell cycle dysregulation, and induction of apoptosis by ursolic acid in human non-small cell lung cancer A549 cells. *Life Science* 2004; 2303-2316.

Idaomar M, El Hamss R, Bakkali F, Mezzoug N, Zhiri A, Baudoux D, Muñoz-Serrano A, Liemans V, Alonso-Moraga A. Genotoxicity of some essential oils evaluated by wing spot test of *Drosophila Melanogaster*. *Mutation Research* 2002; 513, P.61-68.

Iarmarcovai G, Botta A, Orsière T. Anomalies chromosomiques de nombre, instabilité génétique et expositions professionnelles. 2007; *Bull Cancer* 94 (4) : 381-8.

Instituto Nacional do Câncer. Ações da enfermagem para o controle do câncer; 2008. Disponível: <http://www.inca.gov.br/enfermagem/index.asp>, Acessado em: 10/12/2010.

Instituto Nacional do Câncer. O Que É O Câncer? 2010. Disponível: <http://www.inca.gov.br>, Acessado em: 08/09/2010.

Kar Chowdhuri D, Nazir A, Saxena DK. Effect of three chlorinated pesticides on hsrw stress gene in transgenic *Drosophila melanogaster*. *Journal of Biochemical and Molecular, Toxicology* 2001; 15: 173-186

Kinghorn BN, Su BN, Jang DD, Chang LC, Lee D, Gu JQ, Carcache-Blanco EJ, Pawlus AD, Lee SK, Park EJ, Cuendet M, Gills JJ, Bhat K, Park HS, Mata-Greenwood E, Song LL, Jang M, Pezzutto JM. Natural inhibitors of carcinogenesis. *Planta Medica* 2004; 70:88, 691-70.

Knasmuller S, Parzefall W, Sanyal R, Ecker S, Schwab C, Uhl M, Mersh-Sundermann V, Williamson G, Hietsch G, Langer L, Darroudi F, Natarajan AT. Use of metabolically competent human hepatoma cells for the detection of mutagens and antimutagens. *Mutation Research* 1998; 402:185-202.

Laohavechvanich P, Kangsadalampai K, Tirawanchai N, Ketterman AJ. Effect of different thai traditional processing of various hot chili peppers on urethane-induced somatic mutation and recombination in *Drosophila melanogaster*: assessment of the role of glutathione transferase activity. *Food and Chemical Toxicology* 2006; 44: 1348-1354.

Lehmann M, Vilar KSP, Franco A, Reguly ML, De Andrade HHR. Activity of topoisomerase inhibitors daunorubicin, idarubicin, and aclarubicin in the drosophila somatic mutation and recombination test environmental and molecular. *Mutagenesis* 2004; 43: 250-257

Marques RC, Medeiros SRB, Dias CS, Barbosa-Filho JM, Agnes-Lima LF. Evaluation of the mutagenic potential of yangambin and of the hydroalcoholic extract of *Ocotea duckei* by the ames test. *Mutation Research* 2003; 536, P.117-120.

Mba CG, Laget M, Guiraud-Dauriac H, De Meo M, Elias R, Dumenil G. The protective activity of α -hederine against H_2O_2 genotoxicity in HepG2 cells by alkaline comet assay. *Mutation Research* 1999; 445: 9–20

Mendonça RC, Felfili JM, Walter BMT, Silva Júnior MC, Rezende AV, Filgueiras TSE, Nogueira PE. Flora Vascular do Cerrado. Pp. 287-556. In: S.M. Sano E S. P. Almeida (Eds.) Cerrado: Ambiente E Flora. Embrapa Cerrados 1998; Planaltina.

Mersch-Sundermann V, Siegfried K, Xim-Jiang Wu, Darroudi F, Kassie F. Use of a human- derived liver cell line for the detection of cytoprotective, antigenotoxic and cogenotoxic agents. *Toxicology* 2004; 198:329-340.

Morikawa T, Sun B, Matsuda H, Wu LJ, Harima S, Yoshikawa M. Bioactive Constituents from chinese natural medicines. xiv. new glycosides of β -carboline-type alkaloid, neolignan, and phenylpropanoid from *Stellaria Dichotoma* L. Var. *Lanceolata* and their antiallergic activities. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 2004; 52: 1194-1199.

Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* 1983; V.65, P. 55-63

Mukhopadhyay I, Saxena DK, Kar Chowdhuri D. Hazardous effects of effluent from the chrome plating industry: 70 kda heat shock protein expression as a marker of cellular damage in transgenic *Drosophila Melanogaster* (Hsp 70-Lacz). *Environmental health perspectives* 2003; 111: 1926-1932.

Nakamura T, Nakazawa Y, Onizuka S, Satoh S, Chiba A, Sekihashi K, Miura A, Yasugahira N, Sasaki YF. Antimutagenicity of tochu tea (an aqueous extract of *Eucommia Ulmoides* leaves): 1. The clastogen-suppressing effects of tochu tea in CHO cells and mice. *Mutation Research* 1997; 388, 7-20.

National Botanic Garden of Belgium [homepage na Internet]. Bélgica: National Botanic Garden of Belgium [atualizada em 5 de janeiro de 2010; acesso em 10 abr 2010]. Disponível em: <http://www.br.fgov.be/RESEARCH/PROJECTS/rubiaceae.php>.

Nazir A, Saxena DK, Kar Chowdhuri D. Induction of hsp 70 in transgenic drosophila: biomarker of exposure against phthalimide group of chemicals. *Biochimica et Biophysica Acta* 2003; 1621: 218-225.

O'Brien NM, Woods JA, Aherne SA, O'callaghan YC. Cytotoxicity, genotoxicity and oxidative reactions in cell-culture models: modulatory effects of phytochemicals. *Biochemical Society Transactions* 2000; 28(2):22-26.

Oliveira PRN, Testa G, Sena SB, Costa WF, Sarragiotto MH, Santin SMO. Saponinas Triterpênicas das Raízes de *Guettarda Pohliana* Müll. Arg. (Rubiaceae). *Química Nova* 2008; Vol. 31, No. 4, 755-758.

Okuda T. Systematics And health effects of chemically distinct tannins in medicinal plants. *Phytochemistry* 2005; 66 2012–2031.

Patel R, Garg R, Maru GB. Chemopreventive herbal anti-oxidants: current status and future perspectives. *Journal Clinical Biochemistry and Nutrition* 2007; 40, P.82-91.

Patel D, Shukla S, Gupta S. Apigenin and cancer chemoprevention: progress, potential and promise (Review). *International Journal of Oncology* 2007; 30: 233-245.

Pelletier SW. Alkaloids, chemical and biological, perspectives. Nove Iorque: John Wiley And Sons, 1983 In: Bhat, S V, Nagasampagi, BA, Sivakumar M. *Chemistry of Natural Products*. 4ª Ed. Nova Delhi: Narosa Publishing House 2007; P. 237.

Philippe G, Nguyen L, Angenot L, Frédérick M, Moonen G, Tits M, Rigo JM. Study of the interaction of antiplasmodial strychnine derivatives with the glycine receptor. *European Journal of Pharmacology* 2006; 530, 15–22.

Philippe G, Demol P, Angenot L, Tits M, Frédérich M. In vivo antimalarial activity of isosungucine, an indolomonoterpenic alkaloid from *Strychnos icaja*. *Planta Medica* 2007; 73, 478–479.

Pierce, BA. *Genética: Um Enfoque Conceitual*. Editora: Guanabara Koogan 3ª Edição; 2011.

Rang DR. *Farmacologia*. Editora: Guanabara Koogan, 4ª Edição; 2009.

Rates SMK. Promoção do uso racional de fitoterápicos: uma abordagem no ensino de farmacognosia. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 2001; V.11 N. 2 P.57-69.

Raskin I, Ribnicky DM, Komarnytsky S, Ilic N, Poulev A, Borisjuk N, Brinker A, Moreno DA, Ripoll C, Yakoby N, O'neal JM, Cornwell T, Pastor I, Fridlender B. Plants and human health in the twenty-first century. *Trends Biotechnol* 2002; 20: 522-531.

Reis SRA, Sadigursky M, Andrade MGS, Soares LP, Espírito Santo AR, Boas DSV. Efeito Genotóxico Do Etanol Em Células Da Mucosa Bucal. *Pesquisa Odontológica Brasileira* 2002; 16: 221-225.

Rezende AAA, Silva MLA, Tavares DC. Rezende KCS, Bastos JK, Lehmann M, Andrade HHR, Guterres ZR, Silva LP, Graf U, Spanó MA. Interference of the dibenzylbutyrolactolic lignan (-)-cubebin on doxorubicin mutagenicity and recombinogenicity in wing somatic cells of *Drosophila Melanogaster*. Submetido Para Publicação: *Food And Chemical Toxicology* (Artigo No Prelo); 2011.

Ribeiro LR; Salvadori DMF, Marques EK. *Mutagênese Ambiental* 2003; 1ª Ed. Canoas: Ed. ULBRA, 356p.

Romero-Jiménez M, Campos-Sánchez J, Analla M, Muñoz-Serrano A, Alonso-Moraga A. Genotoxicity And anti-genotoxicity of some traditional medicinal herbs. *Mutation Research* 2005; 585: 147-155.

Sánchez-Lamar A, Fiore M, Cundari E, Ricordy R, Cozzi R, De Salvia R. *Phyllanthus orbicularis* aqueous extract: cytotoxic, genotoxic, and antimutagenic effects in the CHO cell line. *Toxicology and Applied Pharmacology* 1999; 161, 231-239.

Santa Maria A, Lopez A, Diaz MM, Alban J, Galan De Mera A, Vicente Orellana JA, Pozuelo, JM. Evaluation of the toxicity of *Uncaria Tomentosa* by bioassays in vitro. Journal of Ethnopharmacology 1997; 183–187.

Santos RI. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: Simões, C MO, Schenkel, EP, Gosmann, G, De Mello, JCP, Mentz, LA, Petrovick, PR (Org.). Farmacognosia: da planta ao medicamento. 2ª Ed. Porto Alegre / Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS/ Ed. Da UFRGS 2000; P. 323-354.

Santos AR, Barros MP, Santin SMO, Souza MC, Eberlin MN, Meurer EC, Sarragiotto MH. Constituintes Polares das folhas de *Machaonia Brasiliensis* (Rubiaceae). Química Nova 2004; 27, 525.

Santos SDC, Mello JCP De. Taninos In: Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR (Org.). Farmacognosia: da planta ao medicamento. Porto Alegre. Editora da Universidade. Edufsc 1999; P.323-354.

Scripsema J, Dagnino D, Gosman G. Alcaloides Indólicos. In: Simões CMO, Schenkel EP, Gosman G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR (Org.). Farmacognosia: da planta ao medicamento. 2.Ed. Porto Alegre: Editora da Universidade UFRGS, Florianópolis: Editora da UFSC 2003; P.679-705.

Sepel LMN e Loreto ELS. Um século de Drosophila na genética. Genética na Escola 2010.

Shan BN, Zhang JY, Du XN, LI QX. Immunomodulatory activity and anti-tumor activity of oldenlandia diffusa in vitro. Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi 2001; 21, 370–374.

Silva J Da, Freitas TRO, Marinho JR, Speit G, Erdtmann B. An alkylene single-cell gel electrophoresis (comet) assay for environmental biomonitoring with native rodents. Genetics and Molecular Biology 2000; 23, 241 -245.

Silva J, Erdtmann B, Henriques JAP. Genética Toxicológica 2003; Porto Alegre: Editora Alance.

Silva LMA, Kato L, Oliveira CMA, Delprete PG, Silva CC, Tanaka CMA. Alkaloid from *Galianthe Ramosa* E. L. Cabral (Rubiaceae). In: 1st Brazilian Conference On Natural Products and Xxvii Annual Meeting on Micromolecular Evolution, Systematics And Ecology (Resem). Anais 2007; São Paulo-São Pedro. Bps-181.

Silva LMA, Kato L, Oliveira CMA, Delprete PG, Silva CC, Tanaka CMA. Novo Alcaloide Indólico de *Galianthe Ramosa* E. L. Cabral. In: 31ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. Anais 2008; São Paulo Águas de Lindóia. Pn-185.

Smit HF, Woerdenbag HJ, Singh RH, Meulenbeld GJ, Labadie RP, Zwaving JH. Ayurvedic herbal drugs with possible cytostatic activity. Journal of Ethnopharmacology 1995; V. 47, P. 75-85.

Souza MP, Matos MEO, Machado MIL, Braz Filho R. 1986. Phytochemistry 25, 1419, Kan-Fan C, Brillanceau MH, Husson HP. Journal of Natural Product 1986, 49, 1130, Montagnac A, Litaudon M, Pais, M. Phytochemistry 1987, 46, 973, Senatore F, Aquino R, Simone F, Pizza C. Pharmacological Research Communications 1988, 20, 105, Simone F, Aquino R, Pizza C, Mello JF. Phytochemistry 1989; 28, 199.

Speit G, Hanel S, Helgig R, Seidel A, Hartmann A. Detection of DNA effects in human cells with the comet assay and their relevance for mutagenesis. Toxicology Letters 1996; 88: 91-98.

Speit G, Hartmann A. The Comet Assay (Single Cell Gel Test) – A sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. in: henderson d.s., editor. methods in molecular biology. Human Press 1999; P.203-212.

Struwe L. Gentianales (coffees, dogbanes, gentians and milkweeds). Encyclopedia of Life Sciences, macmillan publishers, nature publishing group 2002.

St. John MA , Xu T. Insights from model systems. Understanding human cancer in a fly. American Journal of Human Genetics 1997; 61: 1006-1010.

Sui M, Fan W. Combination of gamma-radiation antagonizes the cytotoxic effects of vincristine and vinblastine on both mitotic arrest and apoptosis. Int J Radiation Oncology Biol Phys, 2005; 61 (4): 1151 – 8.

Tiburi M, Reguly ML, Schwartzmann G, Cunha KC, Lehmann M, Andrade HHR. Comparative genotoxic effect of vincristine, vinblastine, and vinorelbine in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. Mutation Research 2002; 519 (1-2), 141-149.

Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu JC, Sasaki YF. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. Environmental Molecular Mutageneses 2000; 35: 206-221.

Tinckoo S, Russel S. *Drosophila melanogaster* as a model system for drug discovery and pathway screening. Current Opinion In Pharmacology 2002; 2: 555-560.

Tundis R, Loizzo, Monica R, Menichini F, Statti GA, Menichini F. Biological and pharmacological activities of iridoids. Recent Developments Mini Reviews in Medicinal Chemistry 2008; V.8, N° 4, Pp. 399-420(22).

Uhl M, Helma C, Knasmüller S. Single-Cell Gel Electrophoresis Assays with human-derived hepatoma (HepG2) cells. Mutation Research, 1999; 441:215- 224.

Verpoorte R. Exploration of nature's chemodiversity: the role of secondary metabolites as leads in drug development. Drug Discovery Today 1998; 5: 232-238.

Wong BY, Lau BH, Teel RW. Chinese medicinal herbs modulate mutagenesis, DNA binding and metabolism of Benzo[A]Pyrene 7, 8-Dihydrodiol And Benzo[A] Pyrene 7, 8-Dihydrodiol-9, 10-Epoxy. Cancer Letters 1992a, 62, 123–131.

Wong BY, Lau BH, Tadi PP, Teel RW. Chinese medicinal herbs modulate mutagenesis, DNA binding and metabolism of aflatoxin B1. Mutation Research 1992b; 279, 209–216.

Wong BY, Lau BH, Yamasaki T, Teel RW. Modulation of cytochrome p-450ia1-mediated mutagenicity, dna binding and metabolism of Benzo[A]Pyrene by chinese medicinal herbs. Cancer Letters 1993a; 68, 75–82.

Wong BY, Lau BH, Yamasaki T, Teel RW. Inhibition of dexamethasone-induced cytochrome p450- mediated mutagenicity and metabolism of aflatoxin b1 by chinese medicinal herbs. European Journal Cancer Prevention 1993b; 2, 351–356.

Wong BY, Lau BH, Jia TY, Wan CP. *Oldenlandia diffusa* and *Scutellaria barbata* augment macrophage oxidative burst and inhibit tumor growth. *Cancer Biotherapy Radiopharmaceuticals* 1996; 11, 51–56.

Wong A. Os usos inadequados e os efeitos adversos de medicamentos na prática clínica. *Journal of Pediatrics* 2003; 79:379-380.

Xu GJ, Xu LS, Wang ZT. Species systematization and quality evaluation of commonly used chinese traditional drugs. South-China Edition, Vol. Iv. Fujian Science And Technology Press, Fuzhou 1997; P. 658.

Yong L, Ling Y. Early metabolism evaluation making traditional chinese medicine effective and safe therapeutics. *Journal of Zhejiang University* 2006; V. 7, N. 2, P. 99-106.

Yoshida Y, Wang MQ, Liu JN, Shan BE, Yamashita U. Immunomodulating activity of chinese medicinal herbs and *Oldenlandia diffusa* in particular international. *Journal of Immunopharmacology* 1997; 19, 359–370.

Zucker WV. Taninos does struture determine function? An ecological perspective. *The American Naturalist* 1983; V.121, P. 355-365.

APÊNDICES

Tabela 2. Teste de toxicidade em *Drosophila melanogaster*.

Tratamentos	% Sobrevivência	
	ST	HB
CN	80	75
CGQ 2,5mg/mL	90	70
CGQ 5,0mg/mL	65	70
CGQ 10,0mg/mL	80	70
CGQ 20,0mg/mL	75	75
BETER 0,5mg/mL		75
BETER 1mg/mL		60
BETER 2mg/mL		65
BETER 4mg/mL		35*
BGTRC-6 0,2mg/mL		80
BGTRC-6 0,4mg/mL		75
BGTRC-6 0,8mg/mL		60
BGTRC-6 1,6mg/mL		10*
RC6-2 0,2mg/mL		80
RC6-2 0,4mg/mL		85
RC6-2 0,8mg/mL		75
RC6-2 1,6mg/mL		60

Teste χ^2 . Diferença significativa em relação ao Controle Negativo (CN); * $p < 0,05$; Cruzamento padrão (ST); Cruzamento de alta ativação metabólica (HB).

Tabela 3. Frequências de manchas mutantes observadas em asas de descendentes trans-heterozigotos marcados (*mwh/flr³*) de *D. melanogaster* do cruzamento padrão (ST) após tratamento com (CGF) e (CGQ).

Genótipos e Conc. (mg/mL)	N. de Indiv. (N)	Manchas por indivíduo (no. de manchas) diag. estatístico ^a												Total Manchas mwh ^c (n)
		MSP (1-2 céls) ^b			MSG(>2 céls) ^b			MG			TM			
		m = 2			m = 5						m = 2			
		Fr	Nº	D	Fr	Nº	D	Fr	Nº	D	Fr	Nº	D	
<i>ST</i>														
<i>mwh/flr³</i>														
CN	40	0,45	(18)		0,02	(01)					0,47	(19)		19
DXR(0,125)	40	0,9	(36)	+	1,67	(67)	+	2	(80)	+	4,57	(183)	+	176
CGF (2,5)	40	0,37	(15)	-							0,37	(15)	-	15
CGF (5,0)	40	0,3	(12)	-							0,3	(12)	-	12
CGF (10,0)	40	0,4	(16)	-	0,02	(01)	-				0,42	(17)	-	17
CGF (20,0)	40	0,47	(19)	-							0,47	(19)	-	19
CGQ (2,5)	40	0,32	(13)	-	0,02	(01)	-				0,35	(14)	-	14
CGQ (5,0)	40	0,3	(12)	-	0,05	(02)	-				0,35	(14)	-	14
CGQ(10,0)	40	0,45	(18)	-	0	(00)	-				0,45	(18)	-	18
CGQ(20,0)	40	0,45	(18)	-	0,05	(02)	-				0,5	(20)	-	20

D: Diagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würzler (1988): +, positivo; -, negativo; i, inconclusivo.

- m, fator de multiplicação para a avaliação de resultados significantemente negativos. Nível de significância $\alpha = \beta 0,05$.

^a Incluindo manchas simples *flr³* raras; ^b MSP - Manchas simples pequenas, quando até 2 células afetadas com até 3 células de distância; ^c MSG - Manchas simples grandes, quando mais de 2 células afetadas com até 3 células de distância; ^d MG - Manchas gêmeas, quando possuir células *flr³* e *mwh* simultaneamente; ^e TM – Total de mancha

Tabela 4. Frequências de manchas mutantes observadas em asas de descendentes trans-heterozigotos marcados (*mwh/flr³*) de *D. melanogaster* do cruzamento alta bioativação (HB) após tratamento com (CGF) e (CGQ).

Genótipos e Conc. (mg/mL)	N. de Indiv. (<i>N</i>)	Manchas por indivíduo (no. de manchas) diag. estatístico ^a												Total Manchas mwh ^c (<i>n</i>)
		MSP (1-2 céls) ^b			MSG(>2 céls) ^b			MG			TM			
		<i>m</i> = 2			<i>m</i> = 5						<i>m</i> = 2			
		Fr	N°	D	Fr	N°	D	Fr	N°	D	Fr	N°	D	
<i>HB</i> <i>mwh/flr</i> ³														
CN	40	0,55	(22)		0,07	(03)					0,62	(25)		25
DXR (0,125)	40	0,90	(36)	+	2,70	(108)	+	1,65	(66)	+	5,25	(210)	+	204
CGF (2,5)	40	0,40	(16)	-	0,05	(02)					0,45	(18)	-	18
CGF (5,0)	40	0,35	(14)	-	0,05	(02)	-				0,40	(16)	-	16
CGF (10)	40	0,32	(13)	-	0,10	(04)	-	0,05	(02)	-	0,47	(19)	-	19
CGF (20)	40	0,40	(16)	-	0,05	(02)	-	0,05	(02)	-	0,50	(20)	-	20
CGQ (2,5)	40	0,37	(15)	-	0,02	(01)	-				0,40	(16)	-	16
CGQ (5,0)	40	0,30	(12)	-	0,05	(02)	-	0,02	(01)	-	0,37	(15)	-	15
CGQ (10)	40	0,27	(11)	-	0,05	(02)	-	0,05	(02)	-	0,37	(15)	-	15
CGQ (20)	40	0,22	(09)	-	0,02	(01)	-	0,02	(01)	-	0,27	(11)	-	11

D: Diagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würzler (1988): +, positivo; -, negativo; i, inconclusivo.

- m, fator de multiplicação para a avaliação de resultados significantemente negativos. Nível de significância $\alpha = \beta$ 0,05.

^a Incluindo manchas simples *flr³* raras; ^b MSP - Manchas simples pequenas, quando até 2 células afetadas com até 3 células de distância; ^c MSG - Manchas simples grandes, quando mais de 2 células afetadas com até 3 células de distância; ^d MG - Manchas gêmeas, quando possuir células *flr³* e *mwh* simultaneamente; ^e TM – Total de manchas.

Tabela 5. Frequências de manchas mutantes observadas em asas de descendentes trans-heterozigotos marcados (*mwh/flr³*) de *D. melanogaster* dos cruzamentos padrão (ST) e de alta ativação metabólica (HB) após tratamento com (CGQ) associado à DXR.

Genótipos e Conc. (mg/mL)	N. de Indiv. (N)	Manchas por indivíduo (no. de manchas) diag. estatístico ^a												Total Manchas mwh ^c (n)
		MSP (1-2 céls) ^b			MSG(>2 céls) ^b			MG			TM			
		m = 2			m = 5						m = 2			
		Fr	Nº	D	Fr	Nº	D	Fr	Nº	D	Fr	Nº	D	
<i>ST</i>														
<i>mwh/flr</i> ³														
CN	40	0,32	(13)		0,05	(02)		0,02	(01)		0,40	(16)		16
DXR (0, 125)	40	4,30	(172)	+	3,32	(133)	+	2,87	(115)	+	10,5	(420)	+	406
CGQ (5) + DXR	40	3,45	(138)	-	2,80	(112)	-	2,35	(94)	-	8,60	(344)	-	332
CGQ (10) + DXR	40	3,92	(157)	-	2,82	(113)	-	2,45	(98)	-	9,20	(368)	-	351
CGQ (20) + DXR	40	3,70	(148)	-	3,80	(152)	-	3,50	(140)	-	11,0	(440)	-	425
<i>HB</i>														
<i>mwh/flr</i> ³														
CN	40	0,45	(18)		0,05	(02)		0,02	(01)		0,52	(21)		21
DXR (0, 125)	40	4,90	(196)	+	4,00	(160)	+	3,55	(142)	+	12,45	(498)	+	479
CGQ (5) + DXR	40	5,20	(208)	-	2,65	(106)	-	4,55	(182)	-	12,40	(496)	-	476
CGQ (10) + DXR	40	5,92	(237)	-	2,95	(118)	-	4,22	(169)	-	13,10	(524)	-	502
CGQ (20) + DXR	40	5,12	(205)	-	3,22	(129)	-	4,40	(176)	-	12,75	(510)	-	491

D: Diagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würzler (1988): +, positivo; -, negativo; i, inconclusivo.

- m, fator de multiplicação para a avaliação de resultados significantemente negativos. Nível de significância $\alpha = \beta$ 0,05.

^a Incluindo manchas simples *flr³* raras; ^b MSP - Manchas simples pequenas, quando até 2 células afetadas com até 3 células de distância; ^c MSG - Manchas simples grandes, quando mais de 2 células afetadas com até 3 células de distância; ^d MG - Manchas gêmeas, quando possuir células *flr³* e *mwh* simultaneamente; ^e TM – Total de manchas.

Tabela 6. Frequências de manchas mutantes observadas em asas de descendentes trans-heterozigotos marcados (*mwh/flr³*) de *D. melanogaster* dos cruzamentos padrão (ST) e de alta bioativação (HB) após tratamento com a fração BETER.

Genótipos e Conc. (mg/mL)	N. de Indiv. (<i>N</i>)	Manchas por indivíduo (no. de manchas) diag. estatístico ^a											Total Manchas mwh ^c (<i>n</i>)	
		MSP (1-2 céls) ^b			MSG(>2 céls) ^b			MG			TM			
		<i>m</i> = 2			<i>m</i> = 5						<i>m</i> = 2			
		Fr	Nº	D	Fr	Nº	D	Fr	Nº	D	Fr	Nº		D
<i>ST</i>														
<i>mwh/flr</i> ³														
CN	40	0,45	(18)		0,02	(01)		0,00	(00)		0,47	(19)		19
DXR (0,125)	40	0,90	(36)	+	1,67	(67)	+	2,00	(80)	+	2,95	(183)	+	176
Beter (0,5)	40	0,15	(06)	-	0,05	(02)	-	0,02	(01)	-	0,22	(09)	-	09
Beter (1,0)	40	0,30	(12)	-	0,05	(02)	-	0,02	(01)	-	0,37	(15)	-	15
Beter (2,0)	40	0,22	(09)	-	0,02	(01)	-	0,05	(02)	-	0,30	(12)	-	12
<i>HB</i>														
<i>mwh/flr</i> ³														
CN	40	0,55	(22)		0,07	(03)		0,00	(00)		0,62	(25)		25
DXR (0,125)	40	0,90	(36)	+	2,70	(108)	+	1,65	(66)	+	5,25	(210)	+	204
Beter (0,5)	40	0,77	(31)	i	0,10	(04)		0,05	(02)		0,92	(37)	i	37
Beter (1,0)	40	0,87	(35)	i	0,07	(03)		0,02	(01)		0,97	(39)	i	39
Beter (2,0)	40	0,97	(39)	+	0,02	(01)		0,05	(02)		1,05	(42)	+	42

D: Diagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würigler (1988): +, positivo; -, negativo; i, inconclusivo.

- m, fator de multiplicação para a avaliação de resultados significantemente negativos. Nível de significância $\alpha = \beta$ 0,05.

^a Incluindo manchas simples *flr³* raras; ^b MSP - Manchas simples pequenas, quando até 2 células afetadas com até 3 células de distância; ^c MSG - Manchas simples grandes, quando mais de 2 células afetadas com até 3 células de distância; ^d MG - Manchas gêmeas, quando possuir células *flr³* e *mwh* simultaneamente; ^e TM – Total de manchas.

Tabela 7. Frequências de manchas mutantes observadas em asas de descendentes trans-heterozigotos marcados (MH) e heterozigotos balanceados (BH) de *D. melanogaster* do cruzamento de alta bioativação (HB) após tratamento com a fração BGTRC-6.

Genótipos e Conc. (mg/mL)	N. de Indiv. (N)	Manchas por indivíduo (no. de manchas) diag. estatístico ^a											Total Manchas mwh ^c (n)	
		MSP (1-2 céls) ^b			MSG(>2 céls) ^b			MG			TM			
		<i>m</i> = 2			<i>m</i> = 5						<i>m</i> = 2			
Fr	Nº	D	Fr	Nº	D	Fr	Nº	D	Fr	Nº	D			
<i>HB</i>														
<i>mwh/flr</i> ³														
CN	40	0,62	(25)		0,00	(00)		0,00	(00)		0,62	(25)		25
DXR (0, 125)	40	3,90	(156)		1,95	(78)		3,40	(136)		9,25	(370)		364
BGTRC-6 (0,2)	40	0,75	(30)	i	0,00	(00)		0,00	(00)		0,75	(30)		30
BGTRC-6 (0,4)	40	1,22	(49)	+	0,07	(03)	i	0,00	(00)		1,30	(52)	+	52
BGTRC-6 (0,8)	40	1,32	(53)	+	0,12	(05)	+	0,07	(03)		1,52	(61)	+	61
BGTRC-6 (1,6)	00	Tóxico												
<i>mwh/TM3</i>														
CN	40	0,35	(14)		0,05	(02)					0,40	(16)		16
DXR (0, 125)	40	0,80	(32)		0,10	(04)	i				0,90	(36)		36
BGTRC-6 (0,2)	40	0,25	(10)	-							0,25	(10)	-	10
BGTRC-6 (0,4)	40	0,70	(28)	+							0,70	(28)	+	28
BGTRC-6 (0,8)	40	0,77	(31)	+							0,77	(31)	+	31

D: Diagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würzler (1988): +, positivo; -, negativo; i, inconclusivo.

- m, fator de multiplicação para a avaliação de resultados significantemente negativos. Nível de significância $\alpha = \beta$ 0,05.

^a Incluindo manchas simples *flr³* raras; ^b MSP - Manchas simples pequenas, quando até 2 células afetadas com até 3 células de distância; ^c MSG - Manchas simples grandes, quando mais de 2 células afetadas com até 3 células de distância; ^d MG - Manchas gêmeas, quando possuir células *flr³* e *mwh* simultaneamente; ^e TM – Total de manchas.

Tabela 8. Frequências de manchas mutantes observadas em asas de descendentes heterozigotos balanceados (BH) e de descendentes trans-heterozigotos marcados (MH) de *D. melanogaster* do cruzamento de alta bioativação (HB) após tratamento com o alcaloide RC6-2.

Genótipos e Conc. (mg/mL)	N. de Indiv. (N)	Manchas por indivíduo (no. de manchas) diag. estatístico ^a												Total Manchas mwh ^c (n)
		MSP (1-2 céls) ^b			MSG(>2 céls) ^b			MG			TM			
		<i>m</i> = 2			<i>m</i> = 5						<i>m</i> = 2			
Fr	Nº	D	Fr	Nº	D	Fr	Nº	D	Fr	Nº	D			
<i>HB</i>														
<i>mwh/flr</i> ³														
CN	40	0,65	(25)							0,65	(25)		25	
DXR (0, 125)	40	3,90	(156)		1,95	(78)		3,40	(136)		9,25	(370)		364
RC6-2 (0,2)	40	0,80	(32)								0,80	(32)	i	32
RC6-2 (0,4)	40	1,20	(48)	+							1,20	(48)	+	48
RC6-2 (0,8)	40	1,52	(61)	+	0,12	(05)	+				1,52	(66)	+	66
RC6-2 (1,6)	40	1,72	(69)	+	0,05	(02)	i				1,72	(71)	+	71
<i>mwh/TM3</i>														
CN	40	0,35	(14)		0,05	(02)	i				0,40	(14)		16
DXR (0, 125)	40	0,80	(32)	+	0,10	(04)	i				0,90	(36)	+	36
RC6-2 (0,2)	40	0,65	(26)	i							0,65	(26)	i	26
RC6-2 (0,4)	40	0,97	(39)	+							0,97	(39)	+	39
RC6-2 (0,8)	40	1,55	(62)	+							1,55	(66)	+	62
RC6-2 (1,6)	40	2,10	(84)	+							2,10	(84)	+	84

D: Diagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würzler (1988): +, positivo; -, negativo; i, inconclusivo.

- m, fator de multiplicação para a avaliação de resultados significantemente negativos. Nível de significância $\alpha = \beta$ 0,05.

^a Incluindo manchas simples *flr³* raras; ^b MSP - Manchas simples pequenas, quando até 2 células afetadas com até 3 células de distância; ^c MSG - Manchas simples grandes, quando mais de 2 células afetadas com até 3 células de distância; ^d MG - Manchas gêmeas, quando possuir células *flr³* e *mwh* simultaneamente; ^e TM – Total de manchas.

Tabela 9. Valores médios $\pm$ desvio padrão da absorbância obtida no Ensaio de Citotoxicidade (MTT) em células de hepatoma humano (HepG2).

Tratamentos	Absorbância	Sobrevivência celular %
	Média $\pm$ Desvio padrão	
Controle Negativo	1,034 $\pm$ 0,069	100
Doxorrubicina	0,701 $\pm$ 0,048*	65
1μg/mL	1,025 $\pm$ 0,117	99
5μg/mL	0,949 $\pm$ 0,048	91
10μg/mL	0,843 $\pm$ 0,066*	79
50μg/mL	0,131 $\pm$ 0,034**	5
100μg/mL	0,010 $\pm$ 0,007**	0

Doxorrubicina = 10 μ g/mL e Controle Negativo = DMSO < 1%, ANOVA seguido de Teste- Dunett. Diferença significativa em relação ao Controle Negativo, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Tabela 10. Número médio de células com cometas, classes e escore de danos observados em células de hepatoma humano (HepG2) tratados com o alcaloide (RC6-2).

Tratamentos	Média de células com dano	Classes do Cometa				Escore
		0	1	2	3	
Controle Negativo	1 ± 1	99 ± 1	1 ± 1	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
Doxorrubicina	35 ± 10**	65 ± 10	20 ± 2	9 ± 6	6 ± 4	55 ± 23**
1µg/mL	3 ± 2	97 ± 2	1 ± 1	1 ± 0	0 ± 1	4 ± 3
5µg/mL	6 ± 1	94 ± 1	5 ± 2	1 ± 2	0 ± 1	8 ± 0,6
10µg/mL	12 ± 1	88 ± 1	7 ± 1	4 ± 1	2 ± 1	19 ± 2

Doxorrubicina = 2µg/mL e Controle Negativo = DMSO < 1%. ANOVA seguido de Teste- Dunett. Diferença significativa em relação ao Controle Negativo, ** $p < 0,01$.