



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
COORDENAÇÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU*
MESTRADO DE CIÊNCIAS AMBIENTAIS E SAÚDE

Ensaio mutagênico em decocto de *Cochlospermum regium* (Mart. et. Schr.) Pilger (Bixaceae) em *Poecilia reticulata* e linfócitos humanos

FLÁVIA RODRIGUES GOMES FIGUEIREDO

Goiânia
2012

FLÁVIA RODRIGUES GOMES FIGUEIREDO

Ensaio mutagênicos em decocto de *Cochlospermum regium* (Mart. et. Schr.) Pilger (Bixaceae) em *Poecilia reticulata* e linfócitos humanos

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais e Saúde da Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa da Pontifícia Universidade Católica de Goiás como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Aparecido Divino da Cruz

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Flávia Melo Rodrigues

Goiânia
2012



DISSERTAÇÃO DO MESTRADO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS E SAÚDE
DEFENDIDA EM 13 DE MARÇO DE 2012 E CONSIDERADA

Aprovada PELA BANCA EXAMINADORA:

1)

prezente
Prof. Dr. Aparecido Divino da Cruz (Presidente/Orientador)

2)

Prof. Dra. Flávia Melo Rodrigues / PUC Goiás (Co-Orientadora)

3)

Cláudio Carlos da Silva
Prof. Dr. Cláudio Carlos da Silva / PUC Goiás (Membro)

4)

Daniela de Melo e Silva
Prof. Dra. Daniela de Melo e Silva / UFG (Membro Externo)

5)

Prof. Dr. Paulo Roberto de Melo Reis / PUC Goiás (Suplente)

*Aos meus pais heróis, José Pedro e Idemilde,
que me deram todas as oportunidades de crescer como
ser humano e sem os quais eu jamais chegaria aonde
cheguei. E, sobretudo, pelo seu amor incondicional.*

Tudo é pra vocês e por vocês!

*Ao meu esposo e companheiro, Deurivan,
e aos meus amados irmãos, Andréia e Fábio,
pelo apoio, solidariedade, carinho, amor
e incentivo em todas as etapas de
minha vida.*

Minha Família, meus amores, minha vida!

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter concebido força, fé, saúde e perseverança para que eu pudesse me orgulhar diante de cada queda e lutar pelos meus objetivos; E à Nossa Senhora Aparecida, que intercedeu por mim em todos os momentos difíceis...

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela concessão da Bolsa Programa de Suporte à Pós-Graduação de Instituições de Ensino Particulares (PROSUP), que permitiu realização deste estudo;

À Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação da Pontifícia Universidade Católica de Goiás pela concessão das bolsas de iniciação científica aos alunos participantes deste projeto;

Ao Orientador, Professor Dr. Aparecido Divino da Cruz da Pontifícia Universidade Católica de Goiás, pelas orientações e correções, disponibilidade, e fornecimento de todo material e equipamentos necessários para realização deste estudo, pelo apoio e carinho de sempre e pela oportunidade de trabalho no Núcleo de Pesquisas Replicon;

À minha querida Co-orientadora, Professora Dra. Flávia Melo Rodrigues da Pontifícia Universidade Católica de Goiás pelo auxílio na análise estatística, apoio e carinho de sempre;

Ao Professor Dr. Cláudio Carlos da Silva da Pontifícia Universidade Católica de Goiás pelos ensinamentos no laboratório, correções e orientações que com certeza engrandeceram esta pesquisa e pelo apoio e carinho de sempre;

Ao acadêmico do Curso de Biologia da Pontifícia Universidade Católica de Goiás Alex Lucas Hanusch, meu querido “Co-orientador Junior”, por toda disponibilidade de ajuda em todos os procedimentos do laboratório, obrigada pela paciência, dedicação e carinho;

Ao Professor Dr. Paulo Roberto de Melo Reis da Pontifícia Universidade Católica de Goiás pela participação da banca de qualificação desde estudo;

À Professora Dra. Daniela de Melo e Silva da Universidade Federal de Goiás, pela participação como membro externo desta defesa de dissertação, pelas correções e orientações;

À Coordenação e à Secretaria do Mestrado de Ciências Ambientais e Saúde, pela paciência e esmero no atendimento das nossas solicitações, em especial ao secretário Luciano Nunes da Silva.

Aos acadêmicos do Curso de Biologia da Pontifícia Universidade Católica de Goiás João Antônio Xavier Manso, Rafael Pena Veloso e Igor Godinho Portis, alunos de iniciação científica deste projeto, pelo auxílio na coleta de dados, atenção e carinho;

À Lidiane da Penha Souza, praticamente aluna de iniciação deste projeto, pois também realizou testes com esta espécie, pelo auxílio na coleta e preparo do material botânico;

Ao Rafael Cosme Machado, pela paciência e dicas na elaboração deste projeto;

À toda equipe do Núcleo de Pesquisas Replicon da Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Lauana Souza Diniz, Naiany Alves Jaime, Camila Akemi Augusto Mattos, Damiana Miriam da Cruz e Cunha, Aldaires Vieira Melo, Cristiano Luiz Ribeiro, Daiany Ramos Castro, enfim, à toda equipe do laboratório o meu muito obrigada pelo apoio;

À minha amada família José Pedro Gomes, Idenilde Rodrigues Gomes, Fábio Rodrigues Gomes, Andréia Rodrigues Gomes Brito, Igor Rodrigues Gomes Brito, Allison Gomes Brito, Maria Terezinha Gomes.... por estarem do meu lado em todos os momentos da minha vida. Ao meu marido Deurivan Rodrigues Figueiredo, o amor da minha vida, e a sua família que também é minha, e a todos os nossos amigos, muito, muito obrigada sempre... não existem palavras para descrever o que sinto. Enfim, meus amores, meu orgulho.

A todos aqueles que de forma direta ou indireta colaboraram na realização e conclusão deste trabalho, minha profunda gratidão e eterno reconhecimento.

Muitas vezes, as pessoas são egocêntricas, ilógicas e insensatas.

Perdoe-lhes assim mesmo.

Se você é gentil, as pessoas podem acusá-lo de egoísta, interesseiro.

Seja gentil assim mesmo.

Se você é um vencedor, terá alguns falsos amigos e alguns inimigos verdadeiros.

Vença assim mesmo.

Se você é honesto e franco, as pessoas podem enganá-lo.

Seja honesto e franco assim mesmo.

O que você levou anos para construir, alguém pode destruir de uma hora para outra.

Construa assim mesmo.

Se você tem paz e é feliz, as pessoas podem sentir inveja.

Seja feliz assim mesmo.

O bem que você faz hoje pode ser esquecido amanhã.

Faça o bem assim mesmo.

Dê ao mundo o melhor de você, mas isso pode nunca ser o bastante.

Dê o melhor de você assim mesmo.

Veja você que, no final das contas, é entre você e Deus.

Nunca foi entre você e as outras pessoas.

Madre Teresa de Calcutá

RESUMO

FIGUEIREDO, F.R.G. **Ensaio mutagênicos em decocto de *Cochlospermum regium* (Mart. et. Schr.) Pilger (Bixaceae) em *Poecilia reticulata* e Linfócitos humanos.** 2012. 115f. Dissertação de Mestrado - Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Goiânia, 2012.

Cochlospermum regium é uma planta medicinal típica do Cerrado, conhecida como algodãozinho-do-cerrado, muito utilizada pela população como analgésico, antiinflamatório, antiedematogênico e antibacteriano. Porém, muitos constituintes químicos de plantas medicinais podem ser tóxicos e nocivos para a saúde humana. Portanto, faz-se necessário avaliar o potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico do extrato aquoso desta espécie. Com este objetivo foram realizados testes *in vivo* em *Poecilia reticulata* e *in vitro* com linfócitos humanos do sangue periférico. Para ambos foi estimada a concentração letal ($CL_{50/96h}$) do decocto de *C. regium*, além disso, foram realizados o Teste do Micronúcleo (MN) e o Ensaio Cometa (EC). Os testes com *P. reticulata* foram realizados em aquários padronizados com exposição aguda por 96h. A $CL_{50/96h}$ foi estimada em $0,25g.L^{-1}$. Para os testes do MN e EC foram utilizadas as concentrações de $0,25g.L^{-1}$, $0,19g.L^{-1}$, $0,13g.L^{-1}$ e $0,06g.L^{-1}$ além do controle negativo. Conforme as condições experimentais o decocto de *C. regium* apresentou diferença ($p=0,0046$ e $p=0,0007$) entre a concentração de $0,25g.L^{-1}$ com média de $(5,5\pm 1,5)$ micronúcleos e $(5,6\pm 2,2)$ de alterações eritrócíticas nucleares com o controle negativo $(2,8\pm 1,3)$ e $(2,7\pm 1,6)$ respectivamente, portanto exibindo ação citotóxica e mutagênica pelo teste do micronúcleo. Foram observadas correlação e regressão linear simples positiva entre os danos observados em eritrócitos de *P. reticulata* e as concentrações do decocto avaliadas. Porém, não foi identificada atividade genotóxica pelo ensaio cometa ($p=0,6289$ e $p=0,7677$) em nenhuma das concentrações para os parâmetros comprimento de DNA na cauda do cometa e quantidade de DNA na cauda do cometa, não apresentando também correlação, nem regressão linear simples entre os resultados obtidos e as concentrações avaliadas. Para os ensaios *in vitro* a $CL_{50/96h}$ em linfócitos humanos foi estimada em $1,73g.L^{-1}$. O teste do micronúcleo foi realizado em culturas

completas por 72 horas e ensaio cometa por 3 horas nas concentrações de 1,73g.L⁻¹, 1,29g.L⁻¹, 0,86g.L⁻¹ e 0,43g.L⁻¹ do decocto, CN e CP com Metil Metano Sulfonato na concentração de 80µM e 70 µM respectivamente. O decocto nestas concentrações não apresentou diferença (p=0,6235) com o controle negativo, não exibindo atividade mutagênica em linfócitos humanos binucleados, entretanto, apresentou correlação e regressão linear simples significativas entre as concentrações do decocto e a quantidade de micronúcleos observados. Para o ensaio cometa, considerando os parâmetros comprimento da cauda do cometa (p<0,0001) e quantidade de DNA na cauda do cometa (p=0,0037) foi observada diferença entre as médias obtidas em linfócitos humanos na concentração de 1,73g.L⁻¹ (3,98±0,46 e 0,013±0,003) do decocto de *C. regium* com as médias do controle negativo (0,69±0,13 e 0,003±0,0008), desta forma demonstrando potencial ação genotóxica. Também foi constatado que houve forte correlação e regressão linear simples entre as concentrações avaliadas e os danos observados. Em suma, o decocto de *C. regium* nas concentrações avaliadas em *P. reticulata* e linfócitos humanos apresentou atividades citotóxica, genotóxica e mutagênicas inclusive com relação concentração-dependente. Neste contexto, devido aos danos causados no DNA, o decocto desta espécie e seus produtos nas condições costumeiras é contra-indicado para uso geral pela população.

Palavras-chave: Algodão-do-cerrado, plantas medicinais, Micronúcleo, Ensaio Cometa.

Email: flaviaeivam@hotmail.com

ABSTRACT

Mutagenic assays in decoct of *Cochlospermum regium* (Mart et. Schr.) Pilger (Bixacea) in *Poecilia reticulata* and human lymphocyte. 2012. 115f. Dissertação de Mestrado - Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Goiânia, 2012.

Cochlospermum regium is a typical Cerrado medicinal plant, known as Cotton-do-cerrado, much used by local people as an analgesic, antiinflammatory, and antibacterial antiedematogenic. However, many chemical constituents of medicinal plants can be toxic and harmful to human health. Therefore, it is necessary to evaluate the potential cytotoxic, mutagenic and genotoxic potential of aqueous extract of this species. With this goal in vivo tests were performed in *Poecilia reticulata* and in vitro human peripheral blood lymphocytes. Was estimated for both the lethal concentration (CL50/96h) of decoction of *C. regium* also performed a Micronucleus Test (MN) and comet assay (EC). Tests with *P. reticulata* were conducted in aquaria with standard acute exposure for 96 hours. The CL50/96h was estimated at 0.25 gL⁻¹. For testing the MN and EC concentrations used were 0.25 gL⁻¹, 0.19 gL⁻¹, 0.13 gL⁻¹ and 0.06 gL⁻¹ in addition to the negative control. As the experimental conditions of the decoction *C. regium* showed difference ($p = 0.0046$ and $p = 0.0007$) between the concentration of 0.25 gL⁻¹ with an average of (5.5 ± 1.6) respectively, thus showing cytotoxic and mutagenic by micronucleus test. (2.7 ± 1.3) and erythrocytic nuclear changes with the negative control (2.8 ± 1.5) and linear regression between the positive damage observed in erythrocytes of *P. reticulata* and the concentrations of the decoction evaluated. However, no genotoxic activity was identified by the comet assay ($p = 0.6289$ and $p = 0.7677$) concentrations in any of the parameters for the length of DNA in the comet's tail and quantity of DNA in the comet's tail, also showing no correlation, or simple linear regression between the results obtained and the concentrations tested. For the tests in vitro CL50/96h in human lymphocytes was estimated at 1.73 gL⁻¹. The micronucleus test was performed in whole cultures for 72 hours and comet assay for 3 hours at concentrations of 1.73 gL⁻¹, 1.29 gL⁻¹, 0.86 gL⁻¹ and 0.43 gL⁻¹ of the decoction, CN and CP to methyl methane sulfonate at a

concentration of 80 µM and 70 mM respectively. The decoction these concentrations did not differ ($p = 0.6235$) with the negative control, showing no mutagenic activity in binucleated human lymphocytes, however, correlated and significant linear regression between the concentrations of the decoction and the number of micronuclei observed. For the comet assay, considering the parameters of the comet tail length ($p < 0.0001$) and amount of DNA in the comet's tail ($p = 0.0037$) difference was observed between the means obtained in human lymphocytes at concentrations of 1, 0.013 and 0.003 decoction C. \pm 73g.L-one (0.46 and 3.98 \pm 0.0008), thus demonstrating the potential genotoxicity. \pm 0.003 \pm region with the average negative control (0.13 and 0.69). It was found that there was strong correlation and linear regression between the measured concentrations and the observed damage. In short, the decoction of C. regium concentrations evaluated in P. reticulata and human lymphocytes showed cytotoxic, genotoxic and mutagenic including concentration-dependent. In this context, due to damage DNA, the decoct this species and its products in the customary conditions is contraindicated for use by the general population.

Keywords: Cotton-do-cerrado, medicinal plants, Micronucleus, Comet assay.

SUMÁRIO

| | | |
|----------|---|----|
| 1 | INTRODUÇÃO | 19 |
| 2 | OBJETIVOS | 21 |
| 2.1 | Objetivos gerais | 21 |
| 2.2 | Objetivos específicos | 21 |
| 3 | REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 22 |
| 3.1 | Cerrado..... | 22 |
| 3.1.1 | Plantas Medicinais..... | 25 |
| 3.1.2 | <i>Cochlospermum regium</i> (algodãozinho-do-cerrado)..... | 27 |
| 3.2 | Mutagênese | 33 |
| 3.2.1 | Mutagênese de produtos fitoterápicos..... | 35 |
| 3.3 | Teste de Toxicidade Aguda | 37 |
| 3.4 | Ensaio Mutagênicos..... | 39 |
| 3.4.1 | Teste do Micronúcleo..... | 40 |
| 3.4.2 | Ensaio Cometa | 43 |
| 3.5 | Organismos-teste | 48 |
| 3.5.1 | <i>Poecilia reticulata</i> (Peters, 1860)..... | 49 |
| 3.5.2 | Linfócitos Humanos | 51 |
| 4 | MATERIAL E MÉTODOS | 54 |
| 4.1 | Coleta e preparação do material botânico | 54 |
| 4.2 | Testes em <i>Poecilia reticulata</i> | 56 |
| 4.2.1 | Teste de toxicidade aguda para determinação da CL _{50/96h} | 56 |
| 4.2.2 | Teste do Micronúcleo..... | 58 |
| 4.2.3 | Ensaio Cometa | 58 |
| 4.3 | Testes em linfócitos humanos | 59 |
| 4.3.1 | Determinação da CL _{50/96h} | 59 |
| 4.3.2 | Teste do Micronúcleo..... | 60 |
| 4.3.3 | Ensaio Cometa | 61 |

| | | |
|----------|---|------------|
| 4.4 | Análise Estatística..... | 62 |
| 5 | RESULTADOS | 64 |
| 5.1 | <i>Poecilia reticulata</i> | 64 |
| 5.1.1 | CL _{50/96h} | 64 |
| 5.1.2 | Teste do Micronúcleo..... | 64 |
| 5.1.3 | Alterações eritrocíticas nucleares..... | 67 |
| 5.1.4 | Ensaio Cometa..... | 69 |
| 5.2 | Linfócitos humanos..... | 72 |
| 5.2.1 | CL _{50/96h} | 72 |
| 5.2.2 | Teste do Micronúcleo..... | 72 |
| 5.2.3 | Ensaio Cometa..... | 74 |
| 6 | DISCUSSÃO | 79 |
| 6.1 | Utilização da CL ₅₀ em <i>Poecilia reticulata</i> | 79 |
| 6.2 | Teste do Micronúcleo | 80 |
| 6.3 | Ensaio Cometa..... | 86 |
| 7 | CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES | 89 |
| | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 90 |
| | ANEXOS | 112 |
| | ANEXO A – Autorização para uso de imagem..... | 112 |
| | ANEXO B – Autorização para coleta de <i>Cochlospermum regium</i> (Mart. et. Schr.) Pilger (Bixaceae)..... | 113 |
| | ANEXO C – Aprovação do Comitê de Ética para <i>Poecilia reticulata</i> | 114 |
| | ANEXO D – Dispensa do Comitê de Ética para linfócitos humanos..... | 115 |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|-------------------|---|----|
| TABELA 1- | Estudos realizados com extrato de <i>C. regium</i> . | 32 |
| TABELA 2- | Classes de toxicidade aguda para organismos aquáticos conforme Zucker. | 38 |
| TABELA 3- | Variações mais comuns do pH usado na eletroforese para realização do teste do cometa para detecção de danos no DNA. | 45 |
| TABELA 4- | Resultados do teste do micronúcleo em eritrócitos de <i>Poecilia reticulata</i> de acordo com as concentrações administradas do decocto de <i>Cochlospermum regium</i> . | 65 |
| TABELA 5- | Resultados das Alterações Eritrocíticas Nucleares em forma de Rim (K) e lobadas (L) encontradas em eritrócitos de <i>Poecilia reticulata</i> de acordo com as concentrações administradas do decocto de <i>Cochlospermum regium</i> . | 68 |
| TABELA 6- | Resultados das médias para o parâmetro comprimento da cauda do cometa com as concentrações utilizadas em <i>Poecilia reticulata</i> . | 70 |
| TABELA 7- | Resultados observados em nucleóides de <i>Poecilia reticulata</i> para o parâmetro quantidade de DNA na cauda do cometa conforme concentrações do decocto de <i>Cochlospermum regium</i> avaliadas. | 71 |
| TABELA 8- | Micronúcleos encontrados de acordo com as concentrações administradas de <i>Cochlospermum regium</i> para o teste do micronúcleo em linfócitos T humanos binucleados. | 73 |
| TABELA 9- | Relação entre as concentrações utilizadas em linfócitos T humanos, demonstrando que houve diferença conforme resultados do Teste de Dunn entre as médias apresentadas para o parâmetro comprimento da cauda do cometa. | 75 |
| TABELA 10- | Relação entre as concentrações utilizadas em linfócitos T humanos, demonstrando que houve diferença conforme resultado do Teste de Dunn entre as médias apresentadas para o parâmetro quantidade de DNA na cauda do cometa. | 77 |

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|-------------------|--|----|
| FIGURA 1- | Distribuição geográfica do bioma Cerrado brasileiro e suas áreas de transição e bacias hidrográficas. | 22 |
| FIGURA 2- | Distribuição espacial de áreas com cobertura vegetal natural e cobertura vegetal antropica no Bioma Cerrado brasileiro. | 23 |
| FIGURA 3- | Raiz de <i>Cochlospermum regium</i> (Mart. & Schr.) Pilg.) em forma de xilópodos (A e B); seu caule com aparência ferrugínea (C); e suas folhas (D e E). Autorização de imagem A em Anexo A. | 30 |
| FIGURA 4- | Flores (A, B, C) e frutos (D, E) de <i>Cochlospermum regium</i> (Mart. & Schr.) Pilg.) | 31 |
| FIGURA 5- | Diagramas ilustrando a origem do micronúcleo a partir de um cromossomo inteiro (A) ou fragmento cromossômico acêntrico (B). | 41 |
| FIGURA 6- | Esquema simplificando etapas da realização do teste do micronúcleo em sistema <i>in vivo</i> . | 42 |
| FIGURA 7- | Esquema simplificando etapas da realização do teste do micronúcleo em sistema <i>in vitro</i> . | 42 |
| FIGURA 8- | Esquema com as principais etapas do Teste do Cometa. | 46 |
| FIGURA 9- | Divisão de um cometa em cabeça e cauda. | 47 |
| FIGURA 10- | Programa <i>CometScore</i> Versão 1.5, utilizado pra avaliar células do teste Ensaio Cometa (A); Células sem danos (B) e células com dano mostrando o DNA degradado (C). | 48 |
| FIGURA 11- | Espécimes de <i>Poecilia reticulata</i> (Peters,1860) fêmea (A) e macho (B). | 50 |
| FIGURA 12- | Fotomicrografia mostrando linfócitos humanos normais e binucleados devido à adição de Citocalasina B na cultura, com aumento de 100x. | 52 |
| FIGURA 13- | Exsicata de <i>Cochlospermum regium</i> (Mart. et. Schr.) Pilger) (A); sua ficha de identificação e (C) família onde foi registrada. | 54 |
| FIGURA 14- | Etapas do processamento de raízes de <i>Cochlospermum regium</i> (Mart. et. Schr.) Pilger) coletadas no Cerrado Goiano em (A) total de raízes; (B) medição; (C) pesagem; (D) | |

| | | |
|-------------------|---|----|
| | limpeza; (E, F) fragmentos; (G) trituradas e armazenada. | 55 |
| FIGURA 15- | Preparo do extrato de <i>Cochlospermum regium</i> (Mart. et. Schr.) Pilger). | 56 |
| FIGURA 16- | Preparação dos extratos (A), para exposição em aquários padronizados (B); medição de <i>Poecilia reticulata</i> fêmea (C) e macho (D). | 57 |
| FIGURA 17- | Materiais utilizados para preparação das culturas completas de linfócitos humanos com o decocto de <i>Cochlospermum regium</i> . | 60 |
| FIGURA 18- | Eritrócitos de <i>Poecilia reticulata</i> mononuclear (A) e com presença de micronúcleo (B e C), com aumento de 100x. | 64 |
| FIGURA 19- | Eritrócitos de <i>Poecilia reticulata</i> apresentando AENs com núcleo em forma de rim (K)(A) e lobadas (L)(B), com aumento de 100x. | 67 |
| FIGURA 20- | Imagens de nucleóides individualizados de <i>Poecilia reticulata</i> mostrando nucleóides com a presença de cauda (A) e sem cauda (B) que foram avaliadas pelo software CometScore [®] versão 1.5. | 70 |
| FIGURA 21- | Linfócitos T humanos binucleados (A) normal e com presença de micronúcleo (B e C), com aumento de 100x. | 72 |
| FIGURA 22- | Imagens de células individualizadas de linfócitos T humanos mostrando nucleóides com a presença de cauda (A) e sem cauda (B), avaliados pelo Software CometScore [®] versão 1.5. | 74 |

LISTA DE GRÁFICOS

| | | |
|-------------------|---|----|
| GRÁFICO 1- | Média de micronúcleos observada em cada tratamento realizado em eritrócitos de <i>Poecilia reticulata</i> com o decocto de <i>Cochlospermum regium</i> , conforme resultados do teste de Tukey. ^a e ^b resultados do teste de Tukey. | 65 |
| GRÁFICO 2- | Análise de regressão linear simples entre as concentrações do decocto de <i>Cochlospermum regium</i> e as médias de micronúcleos observados em eritrócitos de <i>Poecilia reticulata</i> . | 66 |
| GRÁFICO 3- | Ilustração das médias das AENs e resultados de Tukey com núcleos reniformes e lobados de acordo com as concentrações de <i>Cochlospermum regium</i> para o teste do micronúcleo em <i>Poecilia reticulata</i> . ^a e ^b resultados do teste de Tukey. | 68 |
| GRÁFICO 4- | Análise de regressão linear simples entre as concentrações do decocto de <i>Cochlospermum regium</i> e as médias das AENs com núcleos reniformes (K) e lobados (L) observados em eritrócitos de <i>Poecilia reticulata</i> . | 69 |
| GRÁFICO 5- | Resultados de média de micronúcleos observados em linfócitos T humanos binucleados e teste de Tukey conforme concentrações avaliadas. ^a e ^b resultados do teste de Tukey. | 73 |
| GRÁFICO 6- | Análise de regressão linear simples entre as concentrações do decocto de <i>Cochlospermum regium</i> e as médias de micronúcleos encontrados em linfócitos T humanos binucleados. | 74 |
| GRÁFICO 7- | Relação entre as concentrações utilizadas em linfócitos T humanos, demonstrando que houve diferença conforme resultados do Teste de Dunn entre as médias apresentadas para o parâmetro comprimento da cauda do cometa. ^a e ^b resultados do teste de Dunn. | 75 |
| GRÁFICO 8- | Análise de regressão linear simples entre as concentrações do decocto de <i>Cochlospermum regium</i> e as médias obtidas para o parâmetro comprimento da cauda do cometa em nucleóides de linfócitos T humanos. | 76 |
| GRÁFICO 9- | Relação entre as concentrações utilizadas em linfócitos T humanos, demonstrando que houve diferença conforme resultado do Teste de Dunn entre as médias apresentadas para a quantidade de DNA na cauda do cometa. ^a e ^b resultados do teste de Dunn. | 77 |

GRÁFICO 10- Análise de regressão linear simples entre as concentrações do decocto de *Cochlospermum regium* e as médias obtidas para o parâmetro quantidade de DNA na cauda do cometa em nucleóides de linfócitos T humanos.

1 INTRODUÇÃO

O Cerrado possui uma variedade considerável de espécies vegetais amplamente utilizadas pelas populações humanas. Para quase todas as árvores, arbustos e ervas do Cerrado há uma profusão de preparações que podem ser obtidos através de chás, extratos, decoctos, infusões, etc. Desde a antiguidade, essas plantas tem sido utilizadas pelo homem com fins medicinais para curar ou aliviar os mais diversos males (SOUZA; FELFILI, 2006; DINIZ *et al.*, 2001).

Segundo a ANVISA (2005), a planta que, em qualquer de suas partes possua substâncias que são utilizadas com finalidade terapêutica ou que sejam precursoras para a síntese químico-farmacêutica, são consideradas plantas medicinais. A espécie *Cochlospermum regium* (Mart. et. Schr.) Pilger (*Bixaceae*) é uma planta medicinal típica do Cerrado (SOUZA; LORENZI, 2008), conhecida popularmente como algodãozinho-do-cerrado (PIO CORREA, 1975). Suas raízes são utilizadas para os mais diversos males, atuando principalmente como analgésico, antidermatogênico, antiinflamatório, depurativo do sangue, purgativo e regulador menstrual (CASTRO *et al.*, 1994; GUARIN NETO, 1987; GUARIN NETO; MORAES, 2003), dentre outros.

Conforme Turolla e Nascimento (2006) existem poucos estudos, apesar da crescente importância dos fitoterápicos, que comprovem a eficácia e a segurança das plantas medicinais. Entre os constituintes químicos das plantas, muitas substâncias podem ser nocivas para a saúde humana, sendo algumas muito tóxicas. Este conhecimento contradiz a falsa idéia de que drogas naturais, preparadas por produtos derivados de plantas, são seguras e isentas de efeitos adversos (CALIXTO, 2000).

A investigação dos efeitos genotóxico, carcinogênico, embriotóxico e ou teratogênico de plantas medicinais como relatam Sanches-Lamar e Flores (1999) tem se tornado uma tendência geral no campo das investigações farmacológicas. Avaliar a atividade terapêutica de fitofármacos em estudos toxigenéticos são de grande importância, desde que o desenho experimental incorpore investigação sobre a indução potencial de danos genéticos nas células expostas, que podem ocasionar diversas enfermidades humanas, variando de malformações congênitas

ao desenvolvimento de tumores (AMES, 1983).

Souza *et al.* (2005) observam que alterações no processo de divisão celular e a incidência de mutações cromossômicas, como quebras cromatídicas, perda de cromossomos inteiros ou formação de micronúcleos, estão associadas a citotoxicidade e genotoxicidade de substâncias em organismos-teste. O ensaio cometa e o teste do micronúcleo são dois biomarcadores que podem ser utilizados para se avaliar dano ao material genético (BOMFIM; CARVALHO, 2008).

O teste do micronúcleo é capaz de detectar corpúsculos extranucleares formados durante a mitose, que resultam de fragmentos cromossômicos acêntricos ou de cromossomos inteiros que não se incorporaram às células-filhas durante a divisão celular. Esse teste pode ser utilizado *in vivo* ou *in vitro* para detectar eventos clastogênicos e aneugênicos (FERRARI, 1991; ALBERTINI *et al.*, 2000; RIBEIRO *et al.*, 2003). Por outro lado, o ensaio cometa fornece um teste de avaliação genotóxica, com a vantagem de ser altamente sensível para vários tipos de dano no DNA (WHITE; RASMUSSEN, 1998; HARTMANN *et al.*, 2003; DA SILVA *et al.*, 2003; GONÇALVES *et al.*, 2003). Ele pode ser aplicado a células de animais ou de vegetais *in vivo* ou *in vitro* (FAIRBAIRN *et al.*, 1995; ANDERSON *et al.*, 1998; SILVA *et al.*, 2003).

Os organismos-teste são espécies de um dado grupo taxonômico, representativos do ambiente, que são utilizados em ensaios biológicos. Em geral os espécimes são submetidos a diferentes concentrações do agente tóxico, por determinado período de tempo (GHERARDI-GOLDSTEIN, 1990). Indicados como organismos-teste, os peixes são os modelos animais mais representativos do meio aquático (BRIGANTE; ESPINDOLA, 2003). A espécie *Poecilia reticulata*, conhecida como Guaru é um peixe com grande capacidade adaptativa, sendo muito utilizado como referência para ensaios biológicos (SILVA *et al.*, 2003).

Os linfócitos humanos do sangue periférico também são utilizados em testes citogenéticos em sistema *in vitro*. Os linfócitos são as principais células responsáveis pela resposta imunológica adaptativa no ser humano (SALVADORI *et al.*, 2003; SIEBRA, 2007).

Neste sentido, o presente estudo utilizou o teste do micronúcleo e o ensaio cometa, para avaliar danos genéticos induzidos pelo extrato aquoso da planta medicinal *C. regium* nos organismos-teste *Poecilia reticulata* e em linfócitos humanos para avaliação de mutagenicidade *in vivo* e *in vitro*, respectivamente.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Analisar a atividade genotóxica e citotóxica de diferentes concentrações do decocto de *Cochlospermum regium* utilizando ensaios mutagênicos em *Poecilia reticulata* e linfócitos humanos.

2.2 Objetivos Específicos

Determinar a toxicidade aguda ou $CL_{50/96h}$ do decocto de *C. regium* em *P. reticulata* e linfócitos humanos.

Investigar a ação mutagênica pelo Teste do Micronúcleo e a ação citotóxica por meio das alterações eritrocíticas nucleares no peixe biomonitor *P. reticulata*.

Estimar a atividade mutagênica de diferentes concentrações de *C. regium* utilizando o Teste do Micronúcleo em Linfócitos do sangue periférico humano.

Avaliar a genotoxicidade de *C. regium* utilizando o Ensaio Cometa em linfócitos humanos e *P. reticulata*.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Cerrado

O termo Cerrado é comumente utilizado para designar um conjunto de ecossistemas que inclui savanas, matas, campos e matas de galeria, que ocorrem no Brasil Central (EITEN, 1977). De acordo com Borlaug (2002), o Cerrado brasileiro é o segundo maior bioma do país. Dados do IBAMA (2009) e ICMBio (2011) indicam que o Cerrado ocupa uma área original de 2.036.448 Km² representando 23,9% de todo o território nacional e integra 11 Estados incluindo Goiás, Tocantins, Maranhão, Piauí, Ceará, Bahia, Minas Gerais, Distrito Federal, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e Paraná. A distribuição geográfica do Cerrado brasileiro esta apresentada na Figura 1.

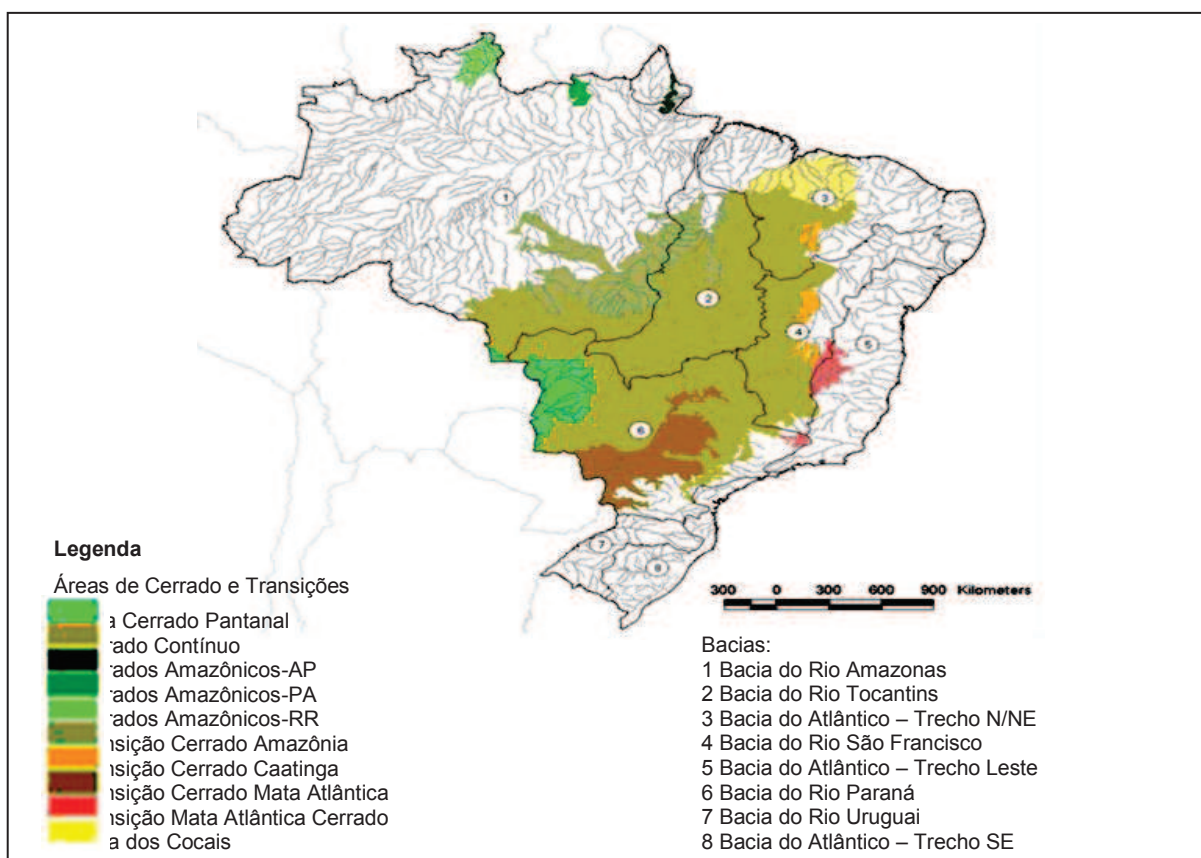


Figura 1 – Distribuição geográfica do bioma Cerrado brasileiro e suas áreas de transição e bacias hidrográficas.

Fonte: ANEEL/IBGE (2000). Modificado.

Coutinho (2002) descreveu para o Cerrado um clima tropical sazonal, de inverno seco, temperatura média anual de 22-23°C, precipitação média de 1200-1800mm, concentradas nos meses de outubro a março, caracterizando a estação chuvosa deste bioma.

Segundo Mendonça *et al.* (1998), a biodiversidade do Cerrado é elevada, pois o número de espécies de plantas vasculares é superior àquele encontrado na maioria das regiões do mundo. Conforme Myers *et al.* (2000) e Crzebieluckas *et al.* (2010) o Cerrado apresenta elevada riqueza biótica, abriga concentrações excepcionais de plantas endêmicas, apesar de ter perdido mais de 70% de sua cobertura vegetal natural. Portanto, o Cerrado é considerado um dos 34 *hotspots* mundiais de biodiversidade. Foglio *et al.* (2006) citam que o conceito de *hotspot* foi criado em 1988 pelo ecólogo inglês Norman Myers para resolver um dos maiores dilemas dos conservacionistas, que era determinar quais as áreas mais importantes para preservar a biodiversidade na Terra, pois a biodiversidade não está igualmente distribuída no planeta.

Segundo Corrêa (2000), em decorrência da pouca atenção destinada ao impacto ocasionado ao meio ambiente, houve perda de parte da biodiversidade, cujas potencialidades econômica, científica e medicinal não são nem sequer conhecidas. Para Machado *et al.* (2004), a grande diversidade de espécies de animais e vegetais do cerrado está associada com a grande diversidade de ambientes. A variação dos ecossistemas ao longo do espaço seria um fator determinante para a ocorrência de um variado número de espécies. Os ambientes do cerrado variam significativamente no sentido horizontal, sendo que áreas campestres, capões de mata, florestas e áreas brejosas podem existir em uma mesma região, o que provocaria um mosaico na vegetação. Segundo Klink e Machado (2005), 44% da flora é endêmica, e nesse sentido, o cerrado é a mais diversificada savana tropical do mundo.

Segundo Pereira e Ribeiro (2007), o aspecto das plantas do cerrado geralmente é bastante peculiar, pois suas árvores e arbustos possuem galhos tortuosos, as folhas costumam ser endurecidas, as cascas dos troncos são grossas, as folhas muitas vezes possuem superfícies brilhantes, algumas recobertas por pêlos e muitas espécies em plena estação seca produzem flores e brotos. Ainda segundo os autores, vários elementos abióticos como as flutuações climáticas, a drenagem e a fertilidade do solo, o relevo, a ocorrência sazonal do fogo e os

afloramentos rochosos contribuem para a caracterização do cerrado. Os autores relatam também que as áreas de transição do cerrado com a Mata Atlântica, a Caatinga, a Floresta Amazônica e o Pantanal abrigam grande diversidade de espécies que colaboram com a diversidade do Cerrado.

De acordo com Sano *et al.* (2007), 61% da cobertura vegetal natural do cerrado corresponde à vegetação savânica, 32% formação florestal e 7% formação campestre. Segundo Mendonça *et al.* (2008), o cerrado apresenta elevada riqueza de espécies, com plantas herbáceas, arbustivas, arbóreas e cipós, totalizando 11.627 espécies vasculares nativas.

Conforme Fonseca *et al.* (1997), a perda da diversidade é atribuída aos fatores como a exploração econômica de recursos naturais, redução dos habitats, caça, extração e poluição (Figura 2). Conforme os autores, o cerrado encontra-se possivelmente com 2/3 de sua área antropizada. Myers *et al.*, (2000), relatam que cerca de 80% da área original do cerrado foi alterada de alguma forma, restando apenas 20% de vegetação em estágio primário.

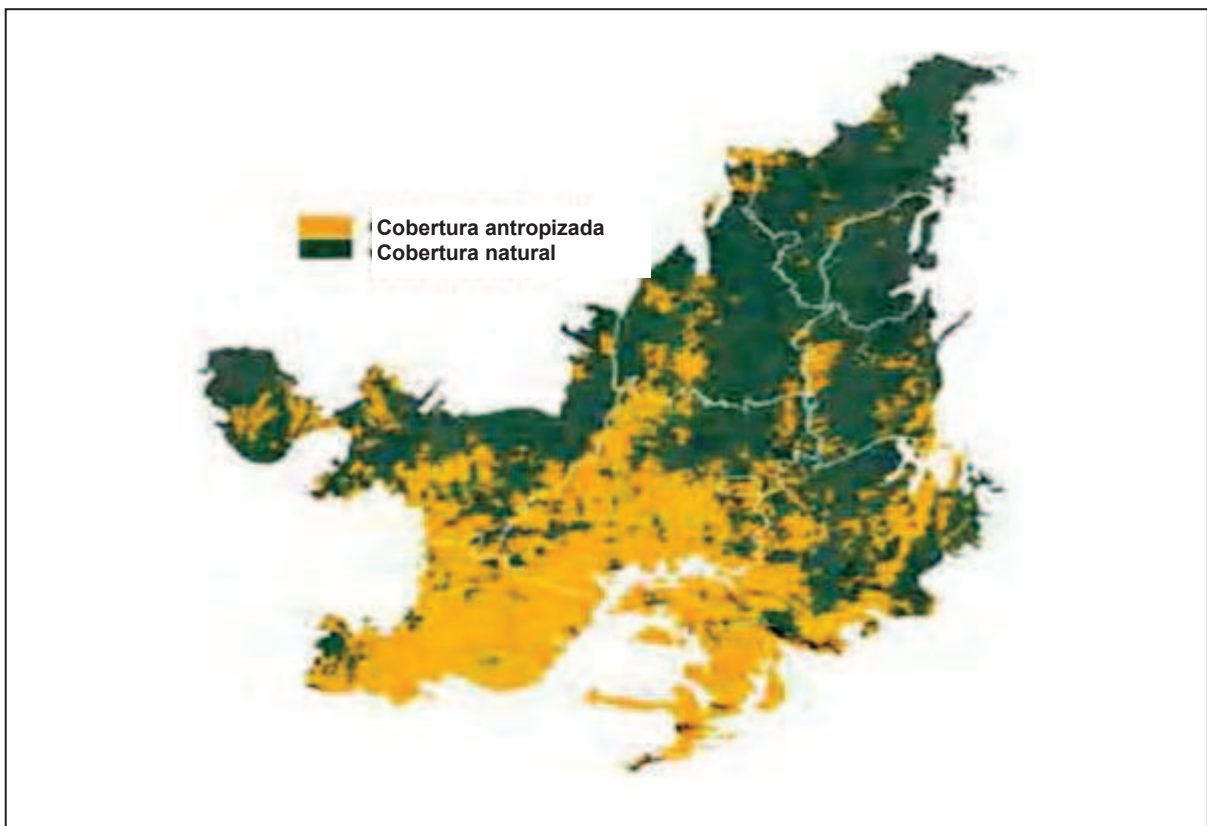


Figura 2 – Distribuição espacial de áreas com cobertura vegetal natural e cobertura vegetal antropica no Bioma Cerrado brasileiro.

Fonte: Sano *et al.* (2007). Modificado.

A degradação do solo, dos ecossistemas nativos e a dispersão de espécies exóticas são as maiores e mais amplas ameaças à biodiversidade do cerrado, todas graves modificações decorrentes das atividades humanas na região. Devido à escala de alteração e degradação já ocorrida no cerrado, uma maior prioridade deveria ser dada à execução de ações que fortaleçam as áreas protegidas já existentes e que criem novas áreas de proteção pois, somente 4,1% do bioma encontram-se em unidade de conservação, sendo que apenas 2,2% de proteção integral (Klink; Machado, 2005).

3.1.1 Plantas Medicinais

Segundo Gottlieb *et al.* (1998), a biodiversidade brasileira, em especial a diversidade vegetal deveria ser considerada importante fonte de riqueza e patrimônio nacional. De acordo com Filho e Yunes (1998), cerca de 75% dos compostos naturais foram isolados de acordo com as recomendações da medicina popular. Segundo Maraschin e Verpoorter (1999), os metabólitos secundários vegetais apresentam grande valor social e econômico. Plantas medicinais utilizadas especialmente sob a forma de chás e extratos fazem parte da medicina complementar aos cuidados com a saúde, por grande parte da população mundial (SIEBRA 2007).

De acordo com Goodland e Ferri (1979), as plantas do cerrado são ricas em metabólitos secundários que podem estar relacionados à tentativa de adaptação dessas plantas à aridez do solo. Os autores relatam também que vários metabólitos presentes em algumas plantas do Cerrado possuem atividade biológica comprovada. Conforme Briskin (2000), a proteção da planta contra microorganismos, herbívoros e intempéries ambientais são papéis exercidos pelos seus metabólitos secundários, que também interferem em processos simbióticos e na atração de polinizadores. Devido à presença de metabólitos secundários em muitas plantas, Mazza e Bittencourt (2000) e Feres *et al.* (2005) relataram que aparentemente esses metabólitos são de difícil separação durante a extração de DNA, e podem interferir nos procedimentos de estudos do material genético.

De acordo com Guarin Neto e Moraes (2003), faz-se necessário valorizar os recursos da enorme riqueza da flora do cerrado que estão sob forte pressão de extinção, como as espécies medicinais. Segundo Ming *et al.* (2003), o cerrado ainda mantém apesar de todo o processo de desmatamento para atividades agropastoris, áreas onde é possível verificar sua riquíssima flora medicinal.

Conforme Foglio *et al.* (2006), o reino vegetal representa um vasto celeiro de moléculas a serem descobertas e relata que grande parte das plantas nativas brasileiras ainda não possuem estudos e respaldo científico quanto a eficácia e segurança ao seu uso medicinal. Para esses autores, pode-se considerar como planta medicinal aquela planta administrada sob qualquer forma e por alguma via ao homem, exercendo algum tipo de ação farmacológica.

Tresvenzol *et al.* (2006), descreveram que o conhecimento sobre plantas medicinais representa muitas vezes o único recurso terapêutico de muitas comunidades e grupos étnicos. Gobbo-Neto e Lopes (2007), relataram que as condições ambientais afetam a síntese dos metabolitos secundários, pois representam uma interface química entre as plantas e o ambiente. De acordo com Souza (2007), o bioma Cerrado ocupa 23% do território nacional e possui grande diversidade genética.

Segundo Silva e Proença (2008), devido ao estágio avançado de antropização e fragmentação do cerrado, torna-se urgente a realização de novas pesquisas etnobotânicas, quanto ao uso popular de sua flora, que ainda foram pouco investigadas. De acordo com dados obtidos na Instrução Normativa nº6/2008 do Ministério do Meio Ambiente, de 23 de setembro de 2008, na Lista Oficial das espécies da Flora Brasileira ameaçadas de extinção, cerca de 28% das espécies estão presentes no cerrado, sendo que deste total, 89% são endêmicas (IBAMA, 2008).

As informações sobre as drogas nacionais, em especial as plantas medicinais regionais são muito deficientes (Sólon, 2009; Sólon *et al.*, 2009). As plantas medicinais por serem de fácil acesso e baixo custo, têm se tornado uma alternativa de utilização pela população frente ao aparecimento de algumas doenças e custo elevado dos medicamentos (Fonseca; Pereira, 2004). Entretanto, os autores salientaram que para sua própria defesa, as plantas são capazes de produzir diferentes substâncias tóxicas e em grandes quantidades.

Lapa *et al.* (2004), relatam que as plantas medicinais são agentes xenobiontes, que apresentam produtos de biotransformação potencialmente tóxicos, e que esses efeitos muitas vezes não são imediatos, mas que podem se instalar por longos períodos de forma assintomática, dificultando a correlação com sua ingestão. Um dos maiores desafios para a químicafarmacológica, bioquímica e farmacologia, consiste na elucidação dos compostos ativos presentes nas plantas e seus mecanismos de ação (Gebhardt, 2000).

3.1.2 *Cochlospermum regium* (algodãozinho-do-cerrado)

Segundo Pio Correia (1975), a espécie *Cochlospermum regium* (Mart. & Schr.) Pilger é conhecida popularmente como algodãozinho-do-campo, algodãozinho-do-cerrado, algodão-bravo, algodão-do-mato, algodãozinho, algodãozinho-cravo, algodoeiro-do-campo, butua-de-corvo, periquiteira-do-campo, pacote, ruibarbo-do-campo e sumaúma-do-igapó.

De acordo com Ritto (1996) e o *Missouri Botanical Garden* (2009), a espécie *C. regium* pertence à família *Cochlospermaceae*. Mas Souza e Lorenzi (2008) relatam uma indefinição relacionada à filogenia do gênero *Cochlospermum* Kunth e, portanto a espécie em questão pertence à família *Bixaceae*. Em território brasileiro existem apenas duas espécies pertencentes ao gênero *Cochlospermum* Kunt, a *C. regium* e a *C. vitifolium*, este gênero possui 11 espécies.

O *Missouri Botanical Garden* (2009), descreve a taxonomia e habitat da espécie como:

| | |
|---------------|---|
| Domínio | <i>Eucariota</i> |
| Reino | <i>Plantae</i> |
| Filo | <i>Magnoliophyta</i> Cronquist, Takht. & W. Zimm. ex Reveal |
| Classe | <i>Magnoliopsida</i> Brongn. |
| Subclasse | <i>Dilleniidae</i> Takht. ex Reveal & Takht. |
| Ordem | <i>Violales</i> Lindl. |
| Família | <i>Cochlospermaceae</i> Planch. |
| Genero | <i>Cochlospermum</i> Kunth |
| Nome botânico | <i>Cochlospermum regium</i> |

A espécie *C. regium* apresenta várias sinomínias científicas de acordo com Solon *et al.* (2009), são elas:

C. insignis St. Hill

C. insigne A. St. Hill

Azeredia pernambucana Arruda

C. insigne var. *mattogrossense* Pilg.

C. insigne var. *pohlium* Eichler

C. tribolum Standl.

Maximiliana regia Schrank

M. regia var. *glaberrima* Chadat & Hassl.

M. regia var. *matogrossensis* (Pilg.) S.F. Blake

Wittelsbachia insignis Mart. & Zucc.

Amoreuxia unipora Tiegh.

A. unipora Tiegh.

De acordo com Castro *et al.* (1994), dentre as riquezas da flora do cerrado, existem inúmeras plantas com comprovado histórico medicinal, dentre elas *C. regium*. Ela é uma planta comum do cerrado brasileiro, encontrada em Cerrado *sensu stricto*, cerradão, campo limpo, campo sujo, campo cerrado, mata ciliar e mata mesofílica (MENDONÇA *et al.*, 1998). *C. regium* já foi encontrada no Paraguai e na Bolívia, nas localidades de Amambay e Santa Cruz, apesar de ter sido considerada endêmica do cerrado brasileiro (LIMA *et al.*, 1995; CHEN-CHEN *et al.*, 2004; SOUZA; LORENZI, 2008).

Esta espécie é um subarbusto com aproximadamente 2m de altura, seus ramos variam de 0,8m a 1,8m de comprimento, o sistema subterrâneo é robusto e lenhoso e Castro *et al.* (2004), descrevem que seu caule possui aparência ferrugenta e suas inflorescências são pentâmeras amareladas (MENDONÇA *et al.*, 1998). A polinização das flores de *C. regium* são realizadas por abelhas (NORONHA; GOTTSBERGER, 1980).

Kirizawa (1981) e Ritto (1996) descreveram detalhadamente *C. regium* como sendo uma espécie que apresenta raiz axial profunda, carnosa e bem desenvolvida, podendo alcançar mais de 3m de comprimento por 20cm de diâmetro e ocorrer à presença de xilopódio. Seu caule é nodoso de lenho leve, aparência ferrugínea. As

folhas são verde escuro, palminérvea, longo-peciolada com 3-5 lobos acuminados ou agudos, sendo estes profundamente lobados, sua superfície é pubescente e a margem foliar coriácea. Quanto aos verticilos florais, ela apresenta cálice irregular, formado por 5 sépalas castanho avermelhadas sendo 2 exteriores e lanceoladas e 3 interiores maiores e largas. Já as pétalas possuem cor amarela, em número de 5 na forma obovada com linhas coccíneas, possui até 6 cm de diâmetro, disposta em panículas. Nos verticilos reprodutores, o androceu é polistêmone e o gineceu apresenta três carpelos de forma globosa com estilete longo e estigma captado. Seu fruto é capsular ovóide loculicida, com 3-5 valvas coriáceas. Possui sementes numerosas com comprimento de 6 a 7 mm, duras e impermeáveis a água e recobertas por pelos longos (Figura 3 e 4).

A importância de *C. regium* não se baseia apenas pelo seu uso popular, mas também na comprovação de efeito analgésico e antidermatogênico (CASTRO *et al.*, 1994). *C. regium* também é conhecido pela atividade antibacteriana em culturas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* (OLIVEIRA *et al.*, 1994). Os xilópodos e as cascas de *C. regium* são utilizados na medicina popular, no preparo de chás para tratar inflamações e depurativo do sangue (GUARIN NETO, 1987). As raízes são cortadas em rodela ou fragmentadas, permanecendo em maceração e utilizadas na elaboração de garrafadas com vinho branco, administrada na forma de ingestão de 3 a 5 cálices diários (PIO CORREA, 1975).

Segundo Maraschin e Verpoorter (1999), desde os tempos mais antigos as plantas vem sendo usadas com propósitos terapêuticos. De acordo com Nunes *et al.* (2003), *C. regium* está entre as 10 espécies mais solicitadas e ou indicadas por raizeiros em levantamentos realizados em 1992 e 2002, constatando que a mesma faz parte do arsenal terapêutico da medicina popular típica do Cerrado brasileiro.

Conforme Guarin Neto e Moraes (2003), o *C. regium* é usado como purgativo, regulador menstrual. Os autores relatam que a espécie está entre as espécies medicinais com maior número de citações, com 23 citações. Tresvenzol *et al.* (2006), citam que *C. regium* está presente na lista das principais plantas medicinais comercializadas em Goiânia (GO) e cidades vizinhas e seus xilópodos são popularmente indicados para infecções ginecológicas, gastrites e ulcera. Souza e Felfili (2006) relatam também que popularmente o *C. regium* é usado para diversos tipos de inflamações.

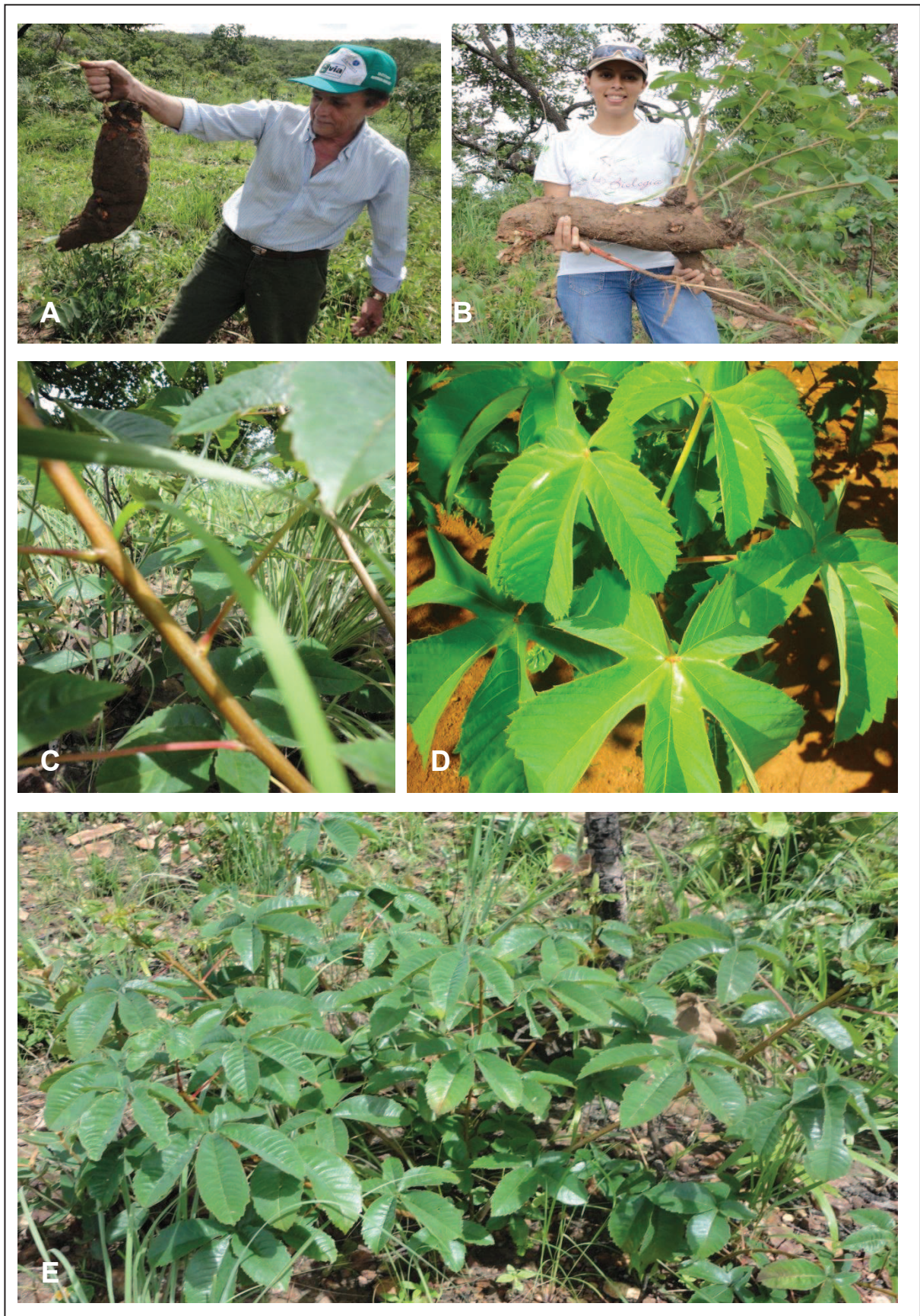


Figura 3 – Raiz de *Cochlospermum regium* (Mart. & Schr.) Pilg.) em forma de xilópodios (A e B); seu caule com aparência ferrugínea (C); e suas folhas (D e E). Autorização de imagem A em Anexo A.

Fonte: Acervo Pessoal.

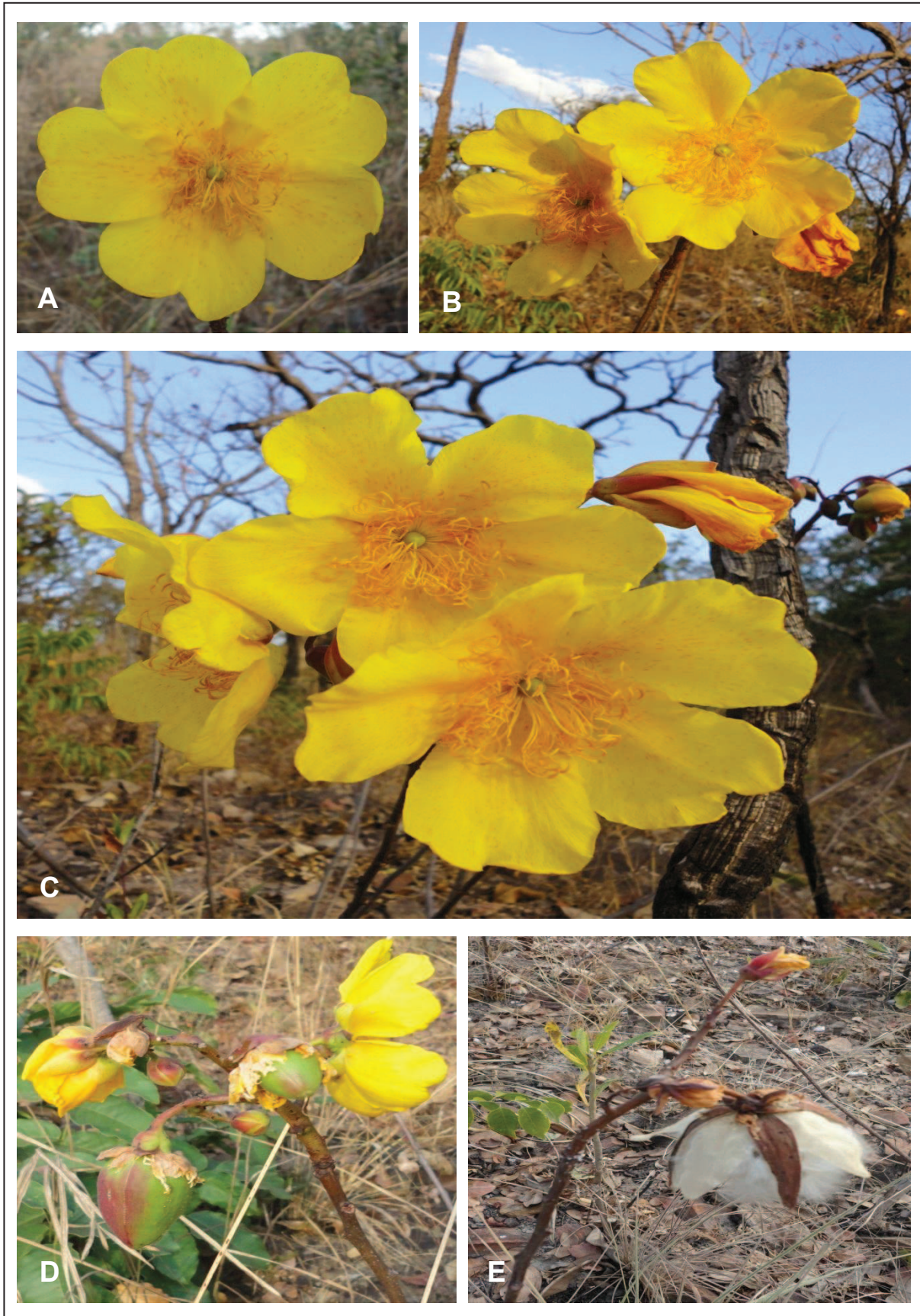


Figura 4 – Flores (A, B, C) e frutos (D, E) de *Cochlospermum regium* (Mart. & Schr.) Pilg.
Fonte: Acervo Pessoal.

No entanto, com o objetivo de confirmar sua segurança e eficácia, foram realizados vários estudos em *C. regium* conforme Tabela 1.

Tabela 1 – Estudos realizados com extrato de *C. regium*.

| Teste | Organismo | Autor |
|--|---------------------------------|-----------------------------|
| SMART e Ring-X-loss | <i>Drosophila melanogaster</i> | (NUNES, 2000) |
| Micronúcleo | camundongos <i>Mus musculus</i> | (SANTOS, 2002) |
| Teste de Ames | <i>Salmonella typhimurium</i> | (CARVALHO, 2002) |
| Avaliação das atividades antinociceptiva, antiinflamatória e antipirética em ratos | | (NETO, 2009) |
| Análise fotoquímica e farmacognóstica de suas raízes | | (SÓLON, 2009) |
| Ênfase nos aspectos etnobotânicos, farmacológicos, toxicológicos e químicos | | SÓLON <i>et al.</i> , 2009) |
| Constituintes químicos | | (ANTUNES, 2009) |
| Estudo agrônomo, químico e biológico | | (Inácio, 2010) |

A partir dos extratos em acetato de etila utilizando os rizomas da espécie, Siqueira *et al.* (1994), e Lima *et al.* (1995) relataram o isolamento de flavonóides dihidro-kaempferol-3-O-glicose e kempferol. Já Ritto (1996), em uma abordagem fitoquímica detectou a presença de núcleos esteroidais e triterpênicos, flavonóides dentre outras, tendo posteriormente isolado e identificado os componentes 1-hidroxi, tetradecanona-3, naningenina e aromadendrina.

Segundo Santos e Blatt (1998) os flavonóides são compostos fenólicos e possuem sua estrutura baseada em 2-fenil-benzopirano (C₆C₃C₆). Camillo (2008), cita que os principais compostos isolados de *C. regium* são flavonóides. Kirizawa (1981) e Ritto (1996) relataram que sua raiz possui taninos e outros compostos fenólicos, mucilagens saponinas, esteróides, triterpenos e flavonóides.

Camilo *et al.* (2009) confirmaram que as raízes de *C. regium* por análises fitoquímicas e farmacológica possuem o flavonóide Kaempferol (F-52), que apresenta propriedades analgésica, antidermatogênica, anti-bacteriana, antioxidante, mutagênica e citotóxica.

Em sua investigação fitoquímica do extrato hidroalcoólico das raízes de *C. regium*, Solon (2009) detectou cinco derivados fenólicos e dois triacilbenzenos conhecidos como Cochlosperminas A e B. A autora ressaltou que o padrão quimiotaxonômico do gênero pode ser caracterizado pela presença de flavonóides, triacilbenzenos e derivados de ácido gálico. E devido à presença de ácidos fenólicos confirmou sua atividade antimicrobiana frente à *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*.

Segundo Pereira *et al.* (2007), na região Centro-Oeste, a espécie *C. regium* foi incluída na lista de espécies medicinais prioritárias para conservação e manejo de recursos genéticos. De acordo com Camillo (2008), no estado do Paraná em 1995 o IBAMA e o Governo do Estado lançaram a lista das plantas medicinais ameaçadas de extinção e dentre elas a espécie *C. regium* foi citada na categoria “Em Perigo”.

3.2 Mutagênese

Com o intuito de estudar o processo de indução de danos ao DNA pela ação de agentes mutagênicos, sejam eles químicos, físicos e/ou biológicos, com possibilidade de resultar em alterações nos genomas dos organismos foi proposta a área de investigação chamada mutagênese. A genética toxicológica objetiva a identificação da capacidade de indução de mutação por substâncias, e o quanto elas podem ser danosas ao homem. Portanto, os testes citogenéticos *in vitro* e *in vivo* tem fornecido informações primárias fundamentais para o estabelecimento do potencial mutagênico de agentes (RABELLO-GAY *et al.*, 1991; SALVADORI *et al.*, 2003; ZEIGER, 2007).

De Robertis *et al.* (2003) e Bernardi (2011) relataram que as mutações podem ocorrer em quaisquer células do corpo, possibilitando sua divisão em três categorias, podendo ser genômicas, cromossômicas ou gênicas. As mutações gênicas ocorrem quando há alterações que envolvem um ou alguns nucleotídeos, enquanto que as mutações cromossômicas são alterações que afetam o cariótipo, podendo ser estruturais ou numéricas. As mutações, segundo a sua origem, podem ser espontâneas quando ocorrem naturalmente, ou induzidas, decorrentes da exposição a agentes conhecidos como mutagênicos (GRIFFITHS *et al.*, 2001). Os efeitos

causados por agentes químicos, físicos e biológicos que podem alterar componentes celulares podem ser classificados como teratogênicos, carcinogênicos e mutagênicos (NUNES, 2000).

Modificações na estrutura do DNA induzidas por agentes químicos ambientais podem prejudicar processos vitais nas células, como a duplicação da molécula de DNA e a transcrição gênica, possibilitando a morte celular e o desenvolvimento de tumores (COSTA; MENK, 2000). Os agentes mutagênicos podem acelerar e/ou aumentar as taxas de mutações (RIBEIRO; MARQUES, 2003). Rabello-Gay *et al.* (1991) relatam que todo agente mutagênico pode ser um potencial carcinógeno, pois erros não reparados no DNA possivelmente tornam-se mutações. Adicionalmente, os efeitos celulares causados por agentes exógenos podem ser citotóxicos e genotóxicos. Agentes citotóxicos podem causar diminuição ou atraso da divisão celular causadas por modificações no aparelho mitótico ou alterações na síntese de macromoléculas essenciais a vida celular (MOREIRA *et al.*, 2004). A ocorrência de problemas decorrentes de agentes genotóxicos dependem de uma cadeia de eventos que envolvam quantidade e via de entrada do composto absorvido, captação pelas células alvo, quando estes são de ação direta, que cheguem ao núcleo e interajam com o DNA e que ocorra fixação dessas lesões genéticas (RAMEL *et al.*, 1986).

Os ensaios mutagênicos são capazes de identificar substâncias com risco a saúde humana. Perturbações no material genético podem ter conseqüências severas e irreversíveis à saúde, pois as mutações gênicas atuam em etapas do processo de carcinogênese. Os efeitos no homem à exposição de agentes genotóxicos incluem câncer, defeitos de nascimento e doenças cardíacas (HOUK, 1992; BORGES-OSORIO; ROBSON, 2001; VARANDA; VARANDA *et al.*, 2006).

Os agentes mutagênicos podem iniciar a formação de tumores, ao desregular o ciclo celular, fazendo com que a célula se reproduza descontroladamente e invadindo tecidos adjacentes, quando estes conseguem penetrar na célula e agredir seu material genético (ALMEIDA NETO *et al.*, 2005). Os autores citam ainda que as mutações do DNA provocam muitas doenças, dentre elas, o câncer, e que essas alterações no DNA podem ser induzidas por vários fatores, entre elas, por substâncias contidas em vegetais. Portanto, é necessário para melhor preservar a saúde humana, conhecer os componentes físicos, químicos e biológicos, que causam alterações gênicas presentes em produtos de uso rotineiro.

Muitos danos sofridos pelo DNA podem ser reparados, pois os processos de reparo do DNA trabalham para garantir a estabilidade do material genético e constitui a principal barreira para protegê-lo. O sistema de reparo pode diferenciar um gene ativo de uma região não codificadora, atuando primeiramente nos sítios mais críticos. Existem vários mecanismos que se encarregam de corrigir os erros no DNA e eles podem ser divididos em: prevenção de erros, reversão de danos, reparo por excisão de bases e reparo pós-replicação (GRIFFITHS *et al.*, 2001; RIBEIRO; MARQUES, 2003; DIAS, 2011). Em suma, De Robertis *et al.* (2003), ressaltam que o sistema de correção de erros no DNA são baseados na própria molécula de DNA, onde suas informações genéticas são complementares nas duas fitas, portanto, quando ocorrer erro em uma fita a outra serve de molde para a correção.

Com a fixação de erros no DNA, a célula normal pode se tornar uma célula cancerígena através de erros sucessivos, já que estes erros fixados são irreversíveis e cumulativos. Os processos de reparação atuam no intuito de manter a integridade do DNA, possibilitando a redução de novas mutações, onde os proto-oncogenes atuam como aceleradores da proliferação celular e os genes supressores de tumor tentam frear esse processo, pois todos os organismos devem replicar seu material genético com precisão (AGNEZ-LIMA *et al.*, 2003; PINTO; FELZENSWALB, 2003).

3.2.1 Mutagênese de produtos fitoterápicos

Muitas plantas medicinais são utilizadas devido ao seu conhecimento e uso popular, pois apesar da crescente importância dos medicamentos fitoterápicos, existem poucos estudos que comprovem sua segurança e eficácia (TUROLLA; NASCIMENTO, 2006). De acordo com Elgorashi *et al.* (2003) e Arora *et al.* (2005) é importante estudar as plantas medicinais tradicionalmente utilizadas, em aspectos como a pesquisa de drogas com potencial quimioterapêutico e também como medida de segurança para seu uso popular. Nota-se, que estudos científicos sobre as atividades e propriedades farmacológicas e toxicológicas são muito escassos.

A comercialização de plantas medicinais e seus derivados ocorrem de diversas formas e podem ser adquiridas em vários lugares como farmácias de manipulação, supermercados ou feiras livres. No Brasil, em vigor desde 24 de

Fevereiro de 2000, a Resolução nº 017/2000 da Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde regulamenta o registro de medicamentos fitoterápicos junto ao Sistema de Vigilância Sanitária. No entanto, essa normatização não é aplicada satisfatoriamente (NETO, 2009).

Segundo Shaw *et al.* (1997), existe a possibilidade de que compostos derivados dessas plantas possam conter substâncias que exerçam efeitos colaterais indesejáveis. De fato, as plantas são capazes de produzir diferentes substâncias tóxicas, pois elas se fazem necessárias para sua própria defesa contra organismos predadores (PEREIRA, 1999).

As plantas medicinais podem conter substâncias tóxicas, portanto faz-se necessário desmistificar a crença que o produto natural não acarreta risco a saúde, podendo ser consumido a vontade. Como qualquer medicamento, os produtos naturais também podem provocar sérios efeitos colaterais (COLAVITTI; FRANCO, 2002). Deve-se considerar do ponto de vista toxicológico, que os produtos naturais não têm apenas efeitos imediatos e correlacionados com sua ingestão, mas que esses efeitos como os carcinogênicos, hepatotóxicos e nefróticos se instalam a longo prazo, e até de forma assintomática (LAPA *et al.*, 2007). Produtos naturais podem apresentar potencial mutagênico e citotóxico, que precisam avaliados e comprovados (FREITAS, 2007).

Ribeiro *et al.* (2003) constataram um aumento nas taxas de mutação devido à utilização constante de produtos como fármacos, agroquímicos, cosméticos dentre outros. Santos *et al.* (2008) também relataram evidências dos efeitos deletérios de extratos de plantas sobre os sistemas biológicos, contrariando o mito popular que extratos naturais exibem apenas propriedades benéficas. Nos extratos naturais, a diversidade química é abundante e cada uma destas moléculas pode apresentar atividades mutagênica, teratogênica e/ou carcinogênica nos sistemas testados. Portanto é importante desenvolver e aperfeiçoar os métodos que permitam a detecção precoce de mutações induzidas por agentes genotóxicos, pois o risco carcinogênico está correlacionado com a intensidade de lesões induzidas e não reparadas no DNA (LOHMANN, 1995).

Muitos tratamentos alternativos com plantas medicinais ocorrem de forma descontrolada e inadequada, sem a devida atenção a questões básicas como, identificação correta da planta, a parte do vegetal utilizada, a forma de preparo e administração, aumentando os riscos à saúde. Por isso os estudos de genotoxicidade

com plantas tem aumentado, pois apesar de possuírem propriedades farmacológicas muitas delas podem causar alterações no DNA (VARANDA, 2006).

Ames (1983), relatou que é comum encontrar substâncias entre os extratos vegetais com atividades citotóxica e ou genotóxica que podem ser associadas ao desenvolvimento de tumores. Todavia faz-se necessários estudos que investiguem os efeitos genotóxicos, carcinogênicos, embriotóxicos, e ou teratogênicos dessas plantas para segurança do uso delas pela população (SÁNCHEZ-LAMAR; FLORES, 1999).

Segundo Souza *et al.* (2006), pode-se avaliar através do monitoramento de alterações fisiológicas e celulares de organismos-teste, as propriedades potencialmente tóxicas de fitoquímicos. O teste de micronúcleo é um dos testes indicados para avaliar efeito mutagênico, pois alguns vegetais apresentam substâncias que acarretam a ocorrência de mutações, sendo necessário estudá-las (ALMEIDA NETO *et al.*, 2005).

Santos *et al.* (2008), também ressaltam a importância de estudos que abordam efeitos genotóxicos e toxicológicos de compostos terapêuticos, pois observam que se os componentes genotóxicos estejam presentes, eles podem intercalar com a molécula de DNA, provocando danos genéticos no controle do ciclo celular e até apoptose, acelerando processos neoplásicos.

A eficácia das matérias-primas vegetais é dada pela comprovação dos efeitos biológicos preconizados através de ensaios farmacológicos pré-clínicos e clínicos e que estes estudos estão gerando novos conhecimentos acerca de uso tradicional de muitos vegetais, obrigando inclusive na revisão de seu uso medicinal (SIMÕES *et al.*, 2000).

3.3 Teste de toxicidade aguda

Para a toxicologia, dependendo da via de administração, tempo e frequência de exposição, dose administrada ou absorvida e das condições de exposição, toda substância pode ser considerada um agente tóxico (OGA, 1996).

Em geral os testes de toxicidade consistem nos procedimentos de exposição do organismo-teste a diferentes concentrações do agente tóxico, com controle de

temperatura, pH e alcalinidade, sendo que os efeitos estabelecidos como mortalidade são avaliados pela comparação com o grupo controle. A CL_{50} ou Concentração Média Letal pode ser definida como a concentração estimada que provoque mortalidade de 50% dos indivíduos expostos a um agente tóxico por um período variável de 24 a 96 horas (RAND; PETROCELLI, 1985). Os autores também relatam que diferentes espécies reagem de forma diferente frente a esses agentes, pois sua toxicidade depende da suscetibilidade dos indivíduos tais como hábitos alimentares, aparato metabólico, fase de desenvolvimento, comportamento dentre outros.

Ao final de 24 a 96 horas, com os dados de mortalidade obtida, determina-se a concentração que causa mortalidade de metade dos organismos expostos, ou seja, a CL_{50} (CETESB, 1999). Conforme Helfrick *et al.* (1996), estas concentrações são expressas em $\mu\text{g.L}^{-1}$ ou mg.L^{-1} .

Fatores ambientais, características químicas do agente avaliado, além do tipo de exposição e da suscetibilidade do indivíduo testado influenciam diretamente na toxicidade de um composto. Segundo Herricks (2002) o efeito esperado varia em função da concentração e do período de tempo em que essa concentração é mantida sobre o sistema. Efeitos sub-letais, como alterações no crescimento, desenvolvimento, comportamento e reprodução, também podem ser observados como efeitos tóxicos, além da mortalidade.

Manrique (2009) descreveu que os resultados do teste de toxicidade aguda em organismos aquáticos podem ser classificadas de acordo com as classes toxicológicas descritas por Zucker (Tabela 2).

Tabela 2 – Classes de toxicidade aguda para organismos aquáticos conforme Zucker.

| Classe de toxicidade | CL_{50} (mg.L^{-1}) |
|-----------------------------|---|
| Extremamente tóxico | < 0,1 |
| Altamente tóxico | 0,1 a 1,0 |
| Moderadamente tóxico | > 1,0 a < 10 |
| Ligeiramente tóxico | > 10 a < 100 |
| Praticamente não-tóxico | > 100 |

Fonte: Manrique (2009).

3.4 Ensaios Mutagênicos

De acordo com a necessidade de se quantificar o risco de indução de danos ao DNA e sua possível transmissão hereditária, foram desenvolvidos vários testes *in vivo* e *in vitro* com a finalidade de se identificar e avaliar a capacidade mutagênica das substâncias químicas (OGA, 1996).

Salvadori *et al.* (2003) ressaltam a importância de estudos detalhados, minuciosos e ordenado das técnicas que permitem identificar e avaliar potenciais agentes mutagênicos. Vários testes de curta-duração que avaliam mutações gênicas, danos cromossômicos ou lesões no DNA estão disponíveis para avaliar o dano genético. Portanto, estes testes devem nortear o sistema de avaliação de novos agentes químicos (MARQUES; RIBEIRO, 2003).

Os ensaios biológicos que avaliam atividades genotóxicas têm sido aperfeiçoados nos últimos anos a fim de garantir confiabilidade dos seus resultados (TAKAHASHI, 2003). Os compostos mutagênicos podem causar efeitos genotóxicos em indivíduos e ou populações expostas, uma vez que são transferidos e acumulados através das cadeias tróficas. Os compostos mutagênicos encontram-se amplamente distribuídos nos ecossistemas (UMBUZEIRO; ROUBICEK, 2006).

Os testes que avaliam genotoxicidade, como o ensaio cometa, e mutagenicidade como o teste do micronúcleo *in vivo* ou *in vitro*, são imprescindíveis na avaliação da segurança do uso de substâncias obtidas de plantas medicinais. Segundo Aquino (2010) os testes possuem a capacidade de detectar compostos que induzem danos genéticos, e ressalta sobre a importância de aliar testes *in vivo* e *in vitro* de uma mesma substância a fim de verificar seus possíveis efeitos nesses sistemas.

Aliar testes com capacidade de detecção diferente é muito proveitoso, pois o teste do micronúcleo difere *a priori* do ensaio cometa no tipo de alteração detectada no DNA. O primeiro detecta lesões irreparáveis, já o segundo detecta lesões primárias, passíveis de correção (VALENTIN; SEVERIN, 2003).

3.4.1 Teste do Micronúcleo

O teste do micronúcleo foi desenvolvido por Schmid e colaboradores segundo Matter e Schmid (1971); Schmid *et al.* (1971); Nichols *et al.* (1972); Schmid (1973), e modificados por Heddle e Colaboradores que também estabeleceram sua origem de acordo com Heddle (1973); Salamone *et al.* (1980); Heddle e Salamone (1981); Carrano e Heddle (1973); Heddle e Carrano (1977) sendo inicialmente desenvolvido em eritrócitos de medula óssea de camundongo por Schmid (1976) (RIBEIRO, 2003).

Os micronúcleos resultantes de danos genéticos induzidos por agentes tóxicos são observados em células em interfase (PINA, 2010). Possuindo cor e textura semelhantes ao núcleo principal, os micronúcleos são massas de cromatina estruturas tipicamente arredondadas envolvidas por uma membrana nuclear formada a partir de fragmentos ou cromossomos inteiros (FENECH, 2000). Apresentam-se separados do núcleo principal da célula em decorrência de danos induzidos nas células parentais durante a mitose ou meiose, quando os fragmentos cromossômicos que resultam de quebras podem não ser incorporados no núcleo principal das células filhas (SALVADORI *et al.*, 2003). O micronúcleo pode ser formado por um cromossomo inteiro, devido a dano no aparelho mitótico ou dano no cromossomo afetado (RIBEIRO, 2003).

Por ser uma técnica simples, detectar tanto agentes clastogênicos que quebram cromossomos quanto aneugênicos que induzem aneuploidia ou segregação cromossômica anormal, é um dos testes de toxicidade genética *in vivo* mais utilizados para a avaliação do risco associado à exposição aos agentes químicos (FENECH, 2000; RIBEIRO, 2003) (Figura 5).

As características fundamentais para a detecção do micronúcleo são: morfologia igual a dos núcleos principais; possuir 1/3 a 1/16 do diâmetro do núcleo principal; mesma coloração ou, eventualmente, maior intensidade que o núcleo principal; não apresentar refringências; deve estar separado do núcleo principal e não pode estar sobreposto a ele (SALVADORI *et al.*, 2003).

Para a realização do teste do micronúcleo *in vivo* segundo Ribeiro (2003), faz-se necessário identificar o animal quanto a sua espécie, sexo, idade e peso, possuir condições adequadas de manutenção destes indivíduos, expor ou administrar a

substância teste, metodologia correta do sacrifício, e obtenção do material de análise, montagem e coloração das lâminas e posterior análise (Figura 6).

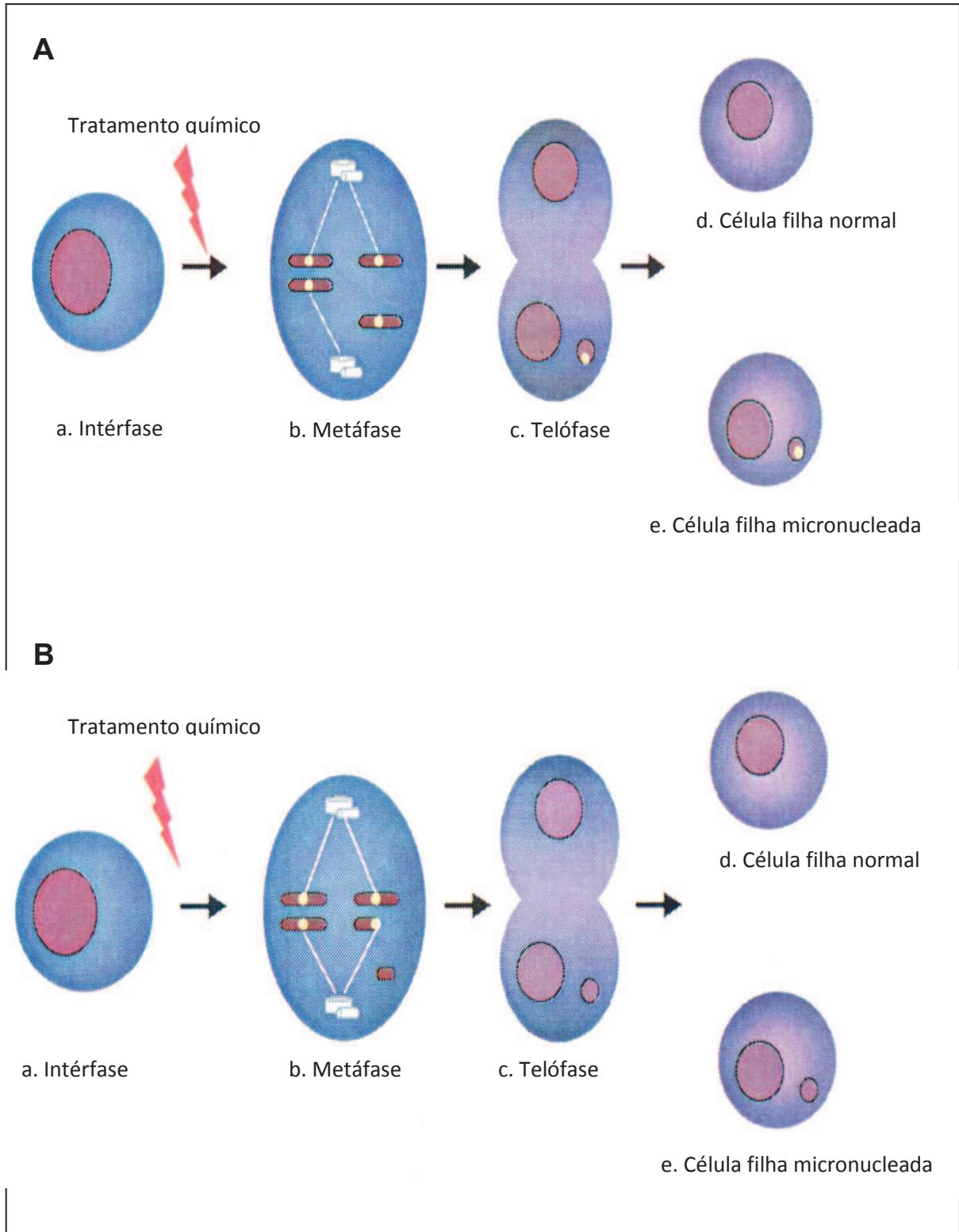


Figura 5 – Diagrama ilustrando a origem do micronúcleo a partir de um cromossomo inteiro (A) ou fragmento cromossômico acêntrico (B).
Fonte: Fenech (2000) adaptado e Ribeiro (2003).

Quanto ao teste do micronúcleo *ex vivo*, utilizando células humanas, em especial os linfócitos T, Salvadori *et al.* (2003) relataram que é uma ferramenta importante que evoluiu rapidamente. As constantes inovações em seu protocolo possibilitam uma gama considerável de aplicação do teste e conseqüentemente na resolução de futuros problemas. De forma simplificada, a metodologia do teste consiste nas etapas descritas na Figura 7.

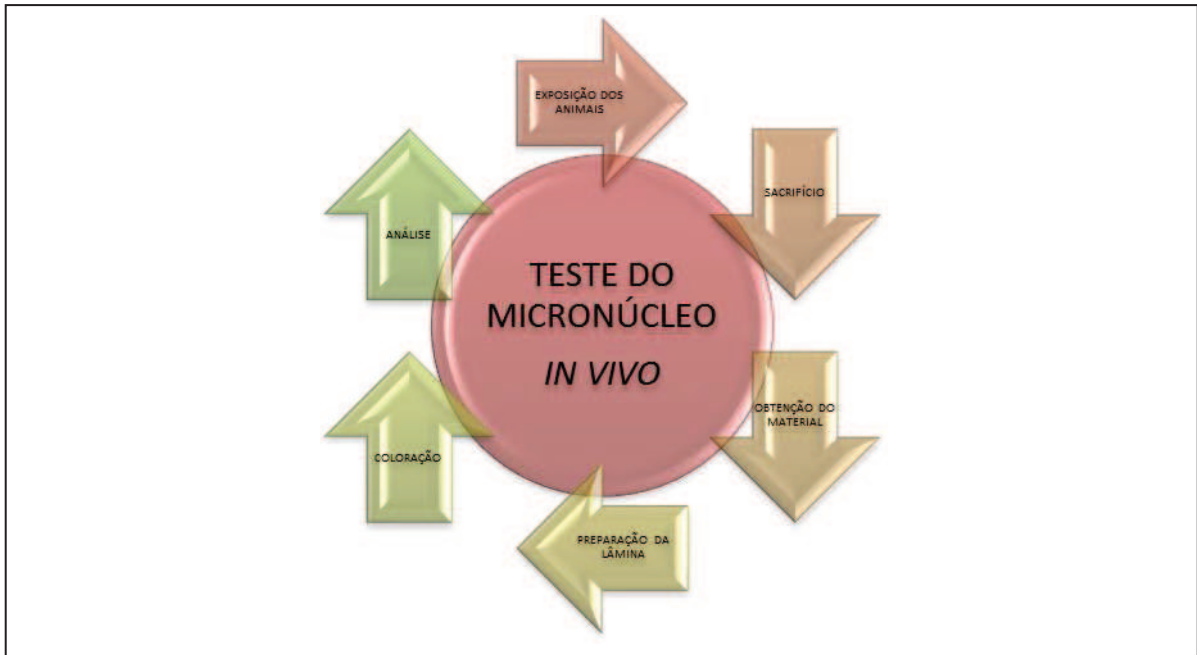


Figura 6 – Esquema simplificando etapas da realização do teste do micronúcleo em sistema *in vivo*.

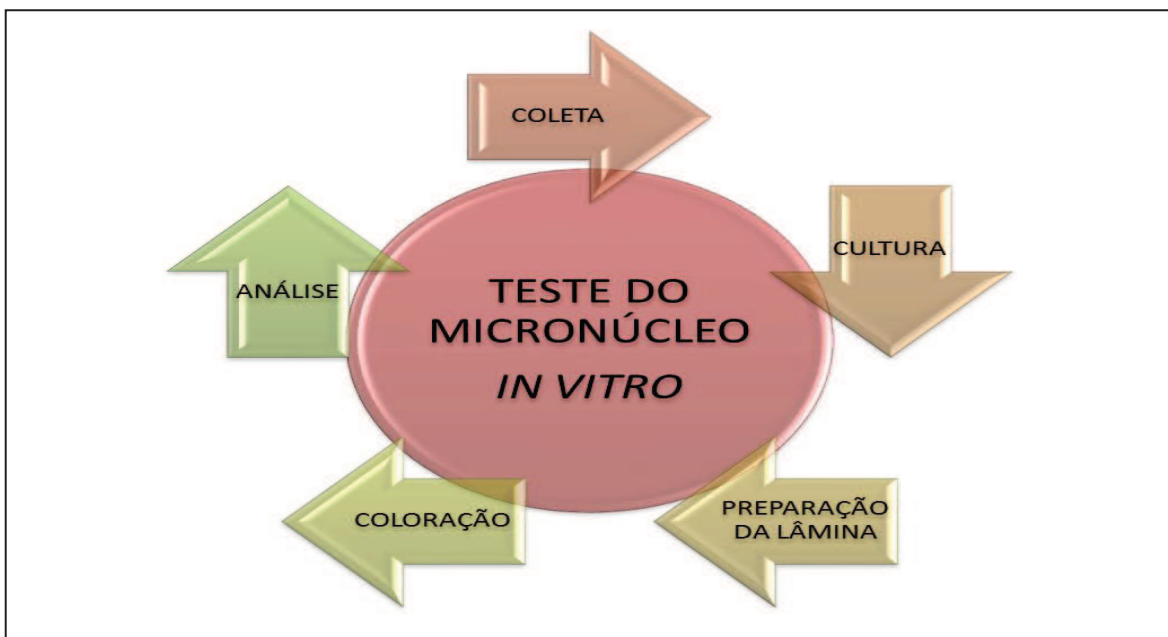


Figura 7 – Esquema simplificando etapas da realização do teste do micronúcleo em sistema *in vitro*.

Os micronúcleos não podem ser formados em células que não se dividem. Portanto, é necessário que as células estejam em estado proliferativo para a realização deste teste (MAVOURIN *et al.*, 1990; SILVA *et al.*, 2003). Souza *et al.* (2006) salientaram que esse teste tem sido utilizado como ferramenta fundamental para a verificação de atividade mutagênica de muitos extratos vegetais. Albertini *et al.* (2000) apontaram que as alterações presentes em linfócitos do sangue periférico humano como os micronúcleos, tem sido considerados como bons biomarcadores de exposição genotóxica e de efeitos precoces de produtos carcinogênicos (IARMARCOVAI *et al.*, 2008).

3.4.2 Ensaio Cometa

Segundo Gontijo e Tice (2003), com o intuito de detectar quebras simples e duplas e sítios alcalilábeis no DNA, o ensaio cometa “*Single Cell Gel Electrophoresis*” foi modificado por Singh *et al.* (1988), e Olive *et al.* (1990), ao protocolo desenvolvido por Ostling e Johanson (1984). Sendo utilizado para a detecção de danos no DNA e reparo de células individualizadas.

A organização do DNA dentro do núcleo influencia seu comportamento em células individualizadas. Após seu enovelamento com proteínas histônicas, o DNA forma alças que são aderidas a uma rede protéica ou matriz nuclear, para ser compactado (COOK; BRAZELL, 1976, 1978; RAZIN *et al.*, 1995; ERIKSSON *et al.*, 2002). Se células embebidas em agarose tiverem suas membranas rompidas por detergentes e suas proteínas nucleares extraídas com altas concentrações de sais, o DNA, maior e mais pesado que os demais componentes, ocupará o espaço no gel, permanecendo retido numa estrutura residual semelhante a um núcleo, designada de nucleóide (COOK; BRAZELL, 1976). As proteínas da matriz nuclear estão dentre as poucas proteínas que resistem a esta extração (OLIVE; BANÁTH, 1995). Desta forma, o nucleóide é uma série de alças superenoveladas de DNA sem histonas, aderidas à matriz nuclear residual, do tamanho do núcleo da célula. Caso existam quebras na molécula de DNA, essa estrutura sofre mudanças, visto que as alças de DNA se desenovelam formando um halo (COOK; BRAZELL, 1976, 1978; VOGELSTEIN *et al.*, 1980).

O ensaio cometa é utilizado para detectar quebras simples e duplas e sítios alcalilábeis no DNA e reparo de células individualizadas. Devido as suas peculiaridades e vantagens quando comparados a outros testes para detecção de substâncias genotóxicas, o teste cometa vem sendo proposto para estudos de toxicogenética. Ele é utilizado para detectar lesões genômicas que após serem processadas podem resultar em mutação. Diferente das mutações, as lesões detectadas pelo teste do cometa são passíveis de correção. É de extrema relevância para a avaliação de compostos genotóxicos, uma vez que, danos no DNA são freqüentemente célula e tecido-específicos. O ensaio cometa permite a detecção de danos e seu reparo em uma única célula, e possivelmente, em determinada população celular (GONTIJO; TICE, 2003).

As vantagens do ensaio cometa incluem sua utilização em qualquer população de células de eucarioto para análise, possibilidade de uso de pequenas amostras de células, sensibilidade para detectar danos no DNA e coleta de dados em células individuais. É caracterizado por combinar as abordagens típicas dos ensaios citogenéticos em células com a simplicidade das técnicas bioquímicas para detecção de quebras de fitas simples e/ou sítios alcalilábeis (SPEIT; HARTMANN, 1999). Quando utilizado para quantificar as lesões no DNA e detectar os efeitos de seu reparo em células individualizadas, segundo Silva (2007), o ensaio cometa é uma técnica eficiente e rápida.

Klaude *et al.* (1996) e Gontijo e Tice (2003) relatam que as características do cometa e o tipo de dano a ser visualizado pelo ensaio, podem ser influenciadas pelas condições de pH da solução de lise e do tampão de eletroforese. Com pH alcalino (>10) o cometa apresenta caudas mais dispersas, porém mais curtas e mais coradas, já com pH pouco alcalino (10-11) sua cauda é mais longa e menos corada enquanto que em condições neutras (7,5) apresentam caudas mais densas. Portanto, a quantidade e qualidade de DNA na cauda de cada cometa pode ser modulada pelo pH da solução de eletroforese. Na Tabela 3 constam os protocolos mais comuns e quais danos podem ser detectados.

O ensaio cometa pode ser utilizado em células de animais e vegetais, *in vivo* e *in vitro* (FAIRBAIRN *et al.*, 1995; ANDERSON *et al.*, 1998 e SILVA *et al.*, 2003). O ensaio cometa pode distinguir entre cancerígenos de ação genotóxica ou não genotóxica, *in vivo*, ou entre danos genotóxicos ou citotóxicos, *in vitro* (TICE *et al.*, 2000).

Tabela 3 – Variações mais comuns do pH usado na eletroforese para realização do teste do cometa para detecção de danos no DNA.

| Versão | Danos que detecta | Observações técnicas | Referência |
|---------------------------|---|---|--|
| Alcalina (pH > 13) | Quebras de fita simples, sítios álcali-lábeis, sítios incompletos de reparo, sítios abásicos, quebras de fita dupla e ligações cruzadas | 1 h de lise; 20-60 min de relaxamento; 10-40 min de eletroforese; 5 min de neutralização. Tampão de eletroforese: 1-2 mM Na ₂ EDTA, 300 mM NaOH, pH > 13 Condições de eletroforese; 300 mA, 0,5-1,0 V/cm à temperatura constante (recomenda-se < 10°C) | Singh <i>et al.</i> (1989); Olive <i>et al.</i> (1990); Tice <i>et al.</i> (2000). |
| Alcalina (pH 12,1 – 12,5) | Quebras de fita simples, sítios incompletos de reparo, quebras de fita dupla e ligações cruzadas | 1 h de lise; 20-60 min de relaxamento; 10-40 min de eletroforese; 5 min de neutralização*. Tampão de eletroforese: 1-2 mM Na ₂ EDTA, 300 mM NaOH, ajustados para o pH 12,1-12,5 com HCl. Condições de eletroforese; 250 mA, 0,5-1,0 V/cm à temperatura constante (recomenda-se < 10°C) | Miyamae <i>et al.</i> (1997) |
| Neutra (pH 7,5 – 9,0)** | Quebras de fita dupla e ligações cruzadas*** | 24 h de lise****; 20 min de relaxamento; 1-2 h de eletroforese; 5 min de neutralização*. Tampão de eletroforese: 300 mM acetato de sódio, 100 mM Tris pH 9 com ácido acético glacial Condições de eletroforese; 50-60 mA, 0,4-0,6 V/cm à temperatura constante (recomenda-se < 10°C) | Singh & Stephens (1997) |

* É recomendável expor as lâminas, por 10min, à solução alcalina (pH > 13) após a eletroforese e antes da neutralização. Isso pode auxiliar na remoção de RNA residual e melhorar a definição das imagens dos cometas por modificações topológicas nas alças do DNA (Singh & Stephens, 1997; Gontijo *et al.*, dados não publicados).

** Aparentemente o comportamento do DNA não sofre mudanças em relação à sua integridade nesses pHs.

*** O teste também é sensível ao relaxamento de alças de DNA que pode ser causado por quebras de fita simples ou por agentes intercalantes (Ostling & Johanson, 1984; Belyaev *et al.*, 1999).

**** Pode ser necessário digerir os nucleóides com proteinase K (1 mg/ml) na solução de lise sem DMSO ou Triton-X por 1-2 h a 37°C. Após a digestão, colocar a cuba de lise com as lâminas em geladeira por 10 min antes de conduzir a eletroforese. Isso pode evitar o deslocamento e a perda de géis das lâminas.

Fonte: Gontijo e Tice (2003).

É fundamental a presença de controle positivo e negativo nos experimentos, pois o ensaio cometa é essencialmente um teste comparativo. Tendo em vista que não existe célula sem dano no DNA, pois são geradas aproximadamente 1000 lesões diárias no DNA/célula, geradas pelo próprio organismo. Portanto, para que o mínimo de DNA migre da cabeça para a cauda do cometa nos controles negativos é modular as condições técnicas que podem ser tempo de relaxamento e eletroforese (GONTIJO; TICE, 2003).

Diferente dos outros testes que detectam danos no DNA, este ensaio requer células viáveis, não necessariamente que estejam em divisão (AHNSTROM, 1988; MONTEITH; VANSTONE, 1995). Gontijo e Tice (2003), esquematizam a realização do teste do cometa, desde a obtenção de células individualizadas até sua visualização em microscopia óptica de fluorescência, conforme Figura 8.

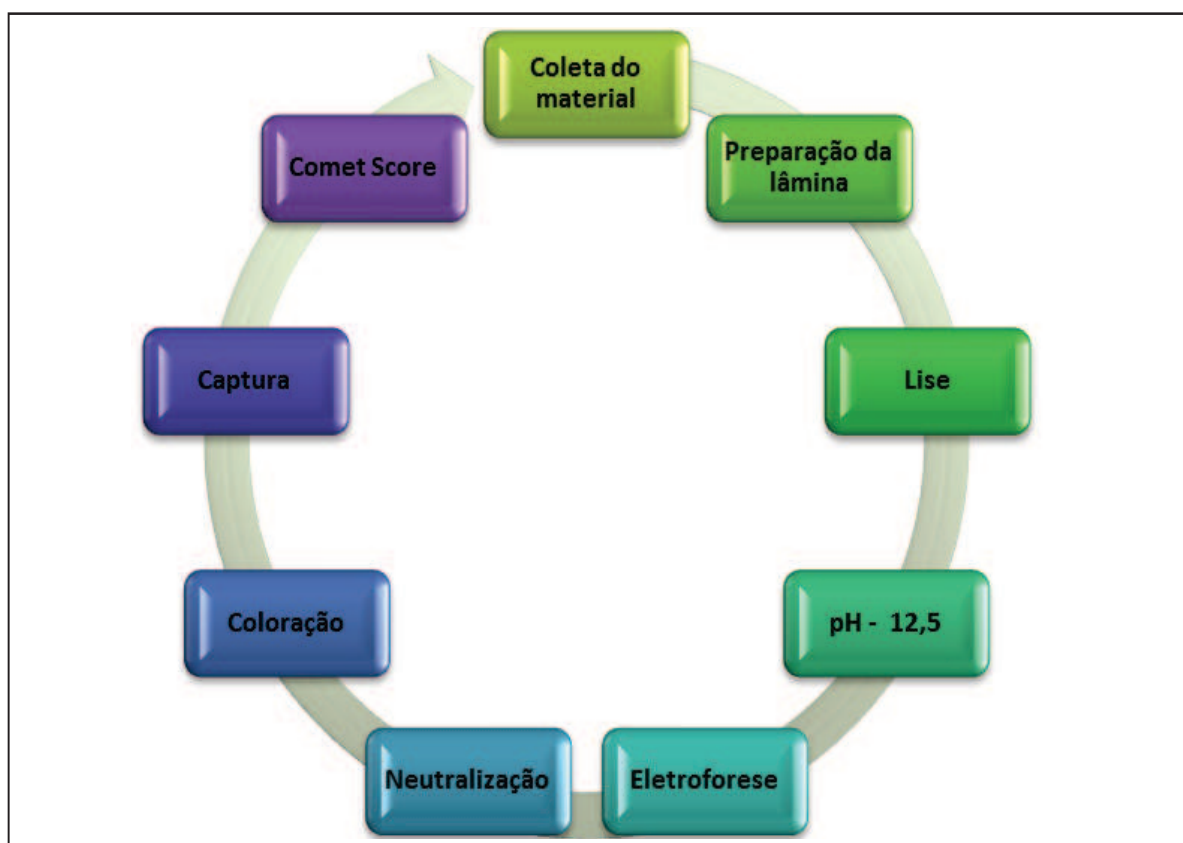


Figura 8 – Esquema com as principais etapas do Teste do Cometa.
Fonte: Gontijo & Tice (2003), adaptado.

Aquino (2010) relatou que o cometa pode ser dividido em cabeça e cauda. Portanto, a interpretação do resultado deste é norteadada por esses dois fatores.

Células sem ou com pouco dano no DNA não apresentariam cauda e as células que apresentassem mais danos apresentariam caudas maiores e mais longas (Figura 9).

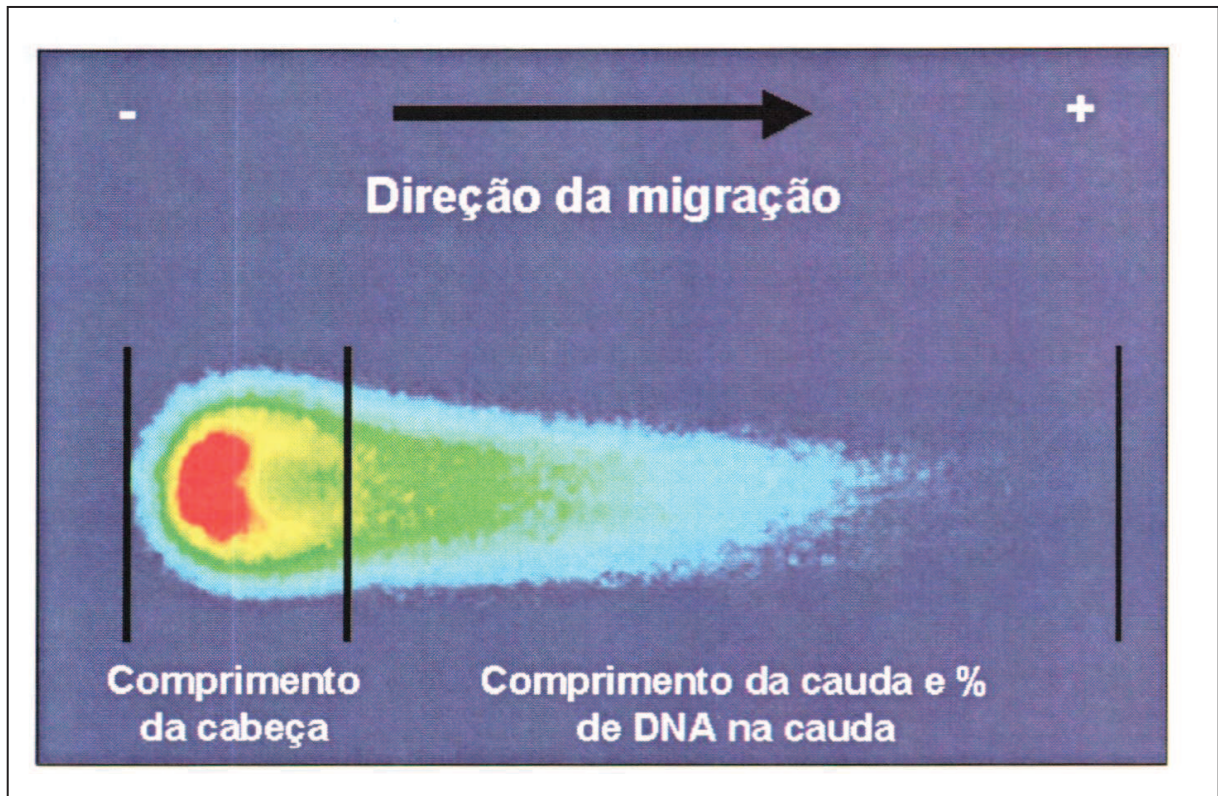


Figura 9 – Divisão de um cometa em cabeça e cauda.
Fonte: Gontijo & Tice (2003).

O *CometScore* (Versão 1.5) é um pacote de *software* utilizado para avaliar cometas produzidos pelo processo de eletroforese em gel de células individualizadas. O programa possui 17 opções de parâmetros para pontuação de cada cometa, incluindo comprimento de cauda, área de cauda, porcentagem de DNA na cauda entre outros. A Figura 10 apresenta uma visão geral sobre o *software CometScore* (AUTOCOMET.COM, 2010). Kuramavel *et al.* (2007) relataram que os programas de análise de imagens de cometa são excelentes ferramentas que permitem quantificar os danos sofridos pelo DNA sob diversos parâmetros.

O ensaio cometa rotineiramente é aplicado em linfócitos do sangue periférico de mamíferos, sendo facilmente amostrados sem necessidade de dissociação celular, podendo ser também utilizado em eritrócitos periféricos de peixes, anfíbios e reptéis (DEVENTER, 1996; NACCI *et al.*, 1996).

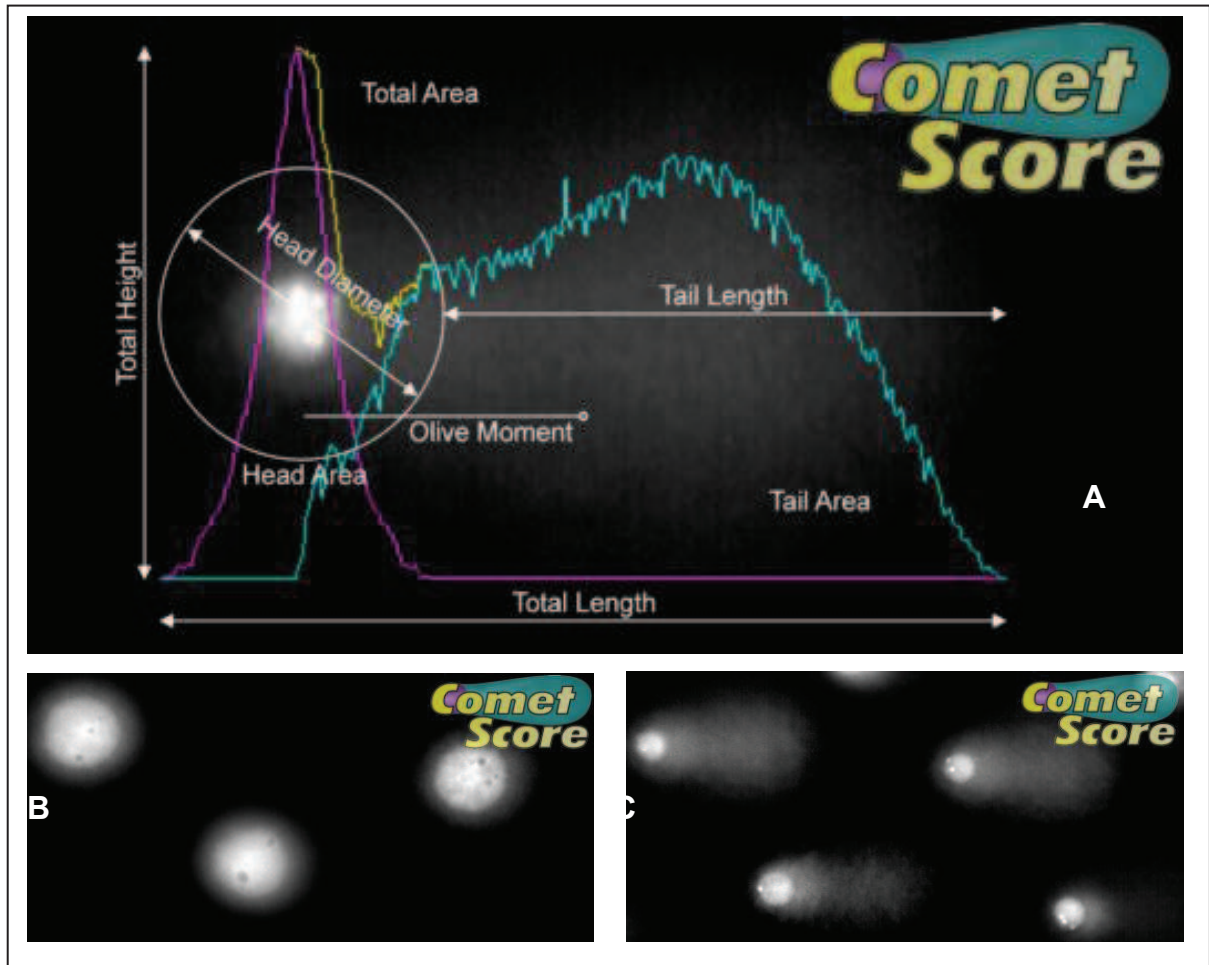


Figura 10 – Programa *CometScore* Versão 1.5, utilizado pra avaliar células do teste Ensaio Cometa (A); Células sem danos (B) e células com dano mostrando o DNA degradado (C).

Fonte: AutoComet.com 2010.

3.5 Organismos-teste

O monitoramento de fitoquímicos com propriedades potencialmente tóxicas, citotóxicas e genotóxicas, podem ser avaliadas por alterações fisiológicas e celulares do organismo-teste e pela ocorrência de mutações cromossômicas, formação de micronúcleos e/ou quebras induzidas nas moléculas de DNA (SOUZA *et al.*, 2006).

Com o intuito de se investigar e comprovar efeitos adversos como alterações bioquímicas, fisiológicas e comportamentais, as análises de genotoxicidade são realizadas em bioindicadores de toxicidade como peixes, mamíferos e invertebrados.

Os efeitos podem ser definidos como “qualquer resposta biológica, ao nível do indivíduo, a um ambiente químico, que traduz a exposição a esse ambiente” (W.H.O., 1993; CAPELA, 2001). A avaliação dos efeitos de agentes tóxicos podem ser realizados em laboratório em testes de toxicidade com organismos aquáticos (GHERARDI-GOLDSTEIN, 1990).

A exposição de um organismo a compostos tóxicos pode ser o fator indutor que leva a formação de alterações na molécula de DNA, ocasionando várias doenças, dentre elas o câncer (MARONI *et al.*, 2000). Segundo Kiss *et al.* (2003), o uso de organismos bioindicadores parece ser estratégia adequada para avaliar os efeitos combinados de substâncias químicas que interagem com os componentes biológicos de forma simultânea e que os ensaios biológicos permitem avaliar os potenciais impactos das substâncias tóxicas aos organismos, constituindo ferramenta importante para estudos toxicológicos e ecotoxicológicos.

Para a realização dos estudos toxicológicos e ecotoxicológicos podem ser utilizados vários organismos-testes dentre eles o teste de mutagenicidade com *Salmonella typhimurium* (Teste de Ames) utilizado para detectar substâncias carcinogênicas genotóxicas (UMBUZEIRO; VARGAS, 2003); teste de mutação gênica em células de mamífero utilizando hamster Chinês (LIMA; RIBEIRO, 2003); teste de micronúcleo em medula óssea de roedores *in vivo* (RIBEIRO, 2003); Teste de mutação e recombinação somática (SMART) em *Drosophila melanogaster* (ANDRADE; LEHMANN, 2003); teste de micronúcleo *in vitro* em células humanas (SALVADORI *et al.*, 2003) e ensaio cometa com o intuito de detectar danos e reparos do DNA em células individualizadas em linfócitos humanos (CONTIJO; TICE, 2003), dentre outros.

3.5.1 *Poecilia reticulata* (PETERS, 1860)

O peixe *Poecilia reticulata* pertence à ordem dos Ciprinodontiformes. Trata-se de um peixe teleósteo, eurialino, conhecido popularmente como guaru (Figura 11). A espécie apresenta grande capacidade adaptativa, sendo utilizado como referência para modelos biológicos (SILVA *et al.*, 2003).



Figura 11 – Espécimes de *Poecilia reticulata* (Peters, 1860) fêmea (A) e macho (B).
Fonte: Acervo pessoal.

O guaru é ovovíparo e apresenta dimorfismo sexual. Os machos são menores e possuem a nadadeira anal modificada em órgão copulador e as fêmeas atingem cerca de 5,0 cm de comprimento. Ambos gostam de águas paradas com vegetação (ALLEN, 1991). Os machos atingem maturidade sexual aos dois meses enquanto as fêmeas aos três meses (RIEHL; BAENSCH, 1991). Estão presentes em diversos habitats aquáticos e se alimentam de cata de presas, poda e cata de itens arrastados pela corrente (KISS *et al.*, 2003). Requerem temperaturas entre 23 e 24°C e 7,4pH, possui ampla faixa de tolerância a salinidade da água (SKELTON, 1993).

Segundo o IBAMA (1987), os guppies são organismos indicados pelo protocolo da OECD de número 203 (*Guideline for Testing Chemicals – “Fish, Acute Toxicity Test”*) para a realização de testes de toxicidade e ecotoxicidade. São peixes

cosmopolitas que apresentam sensibilidade a diversas substâncias tóxicas e se adaptam facilmente as condições de laboratório.

Os peixes, dentre os organismos aquáticos são os animais mais utilizados em bioensaios como bioindicadores de substâncias tóxicas. Na avaliação de alterações provocadas nos peixes são analisados o sangue e órgãos desses animais expostos aos contaminantes em doses sub-letais (HELFRICH *et al.*, 1996; HERRICKS, 2002; VANZLLA, 2003; GONÇALVES, 2004).

O teste de micronúcleo pisceo é realizado usando-se células sanguíneas como uma adaptação do teste realizado em células da medula óssea de ratos (FERRARO *et al.*, 2004). O uso de peixes para o teste de micronúcleo é rápido, simples e se mostra bastante útil para testes de genotoxicidade (AL-SABTI; METCALFE, 1995). De acordo com Ferraro *et al.* (2004), micronúcleos em peixes são considerados bons bioindicadores para estudos de genotoxicidade *in situ* e *ex situ*.

Utilizando peixes como biomonitor, o ensaio cometa e o teste do micronúcleo usam eritrócitos do sangue periférico (DA SILVA *et al.*, 2002). Ao realizar o teste do micronúcleo em peixes, Hooftman e De Raat em 1982 observaram nos núcleos eritrocitários eventuais alterações morfológicas diferentes de seu estado elíptico normal (FERRARO, 2009). As alterações morfológicas nucleares foram fotografadas, descritas e classificadas em: *Blebbbed*, *Lobed*, *Vacuolated*, *Notched*. De modo que núcleos que apresentam uma pequena invaginação da membrana nuclear possuem tamanhos que variam de pequenas protuberâncias até estruturas completamente circunscritas. As alterações que se parecem com os micronúcleos, mas diferem deles porque estão ligadas ao núcleo principal são chamadas de *Blebbbed* (CARRASCO; TYLBURY; MYERS, 1990).

3.5.2 Linfócitos Humanos

Os linfócitos são produzidos nos órgãos linfóides centrais que são a medula óssea e o timo (ABBAS *et al.*, 1995). São células sanguíneas que fazem parte do componente leucocitário. São células arredondadas, com núcleo também arredondado, ocupando quase toda a célula (Figura 12). Quando os linfócitos

migram para o tecido conjuntivo podem ser pleomórficos. São divididos em três tipos funcionais: linfócitos B, linfócitos T e células nulas, sendo todos morfologicamente semelhantes (GARTNER; HIATT, 1999).

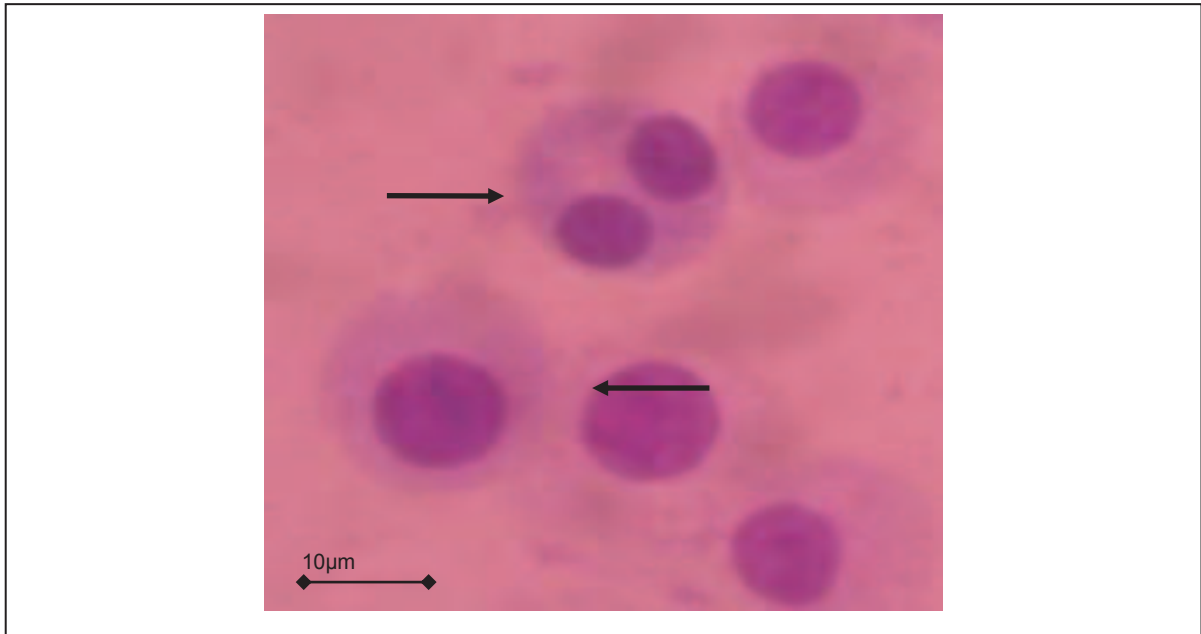


Figura 12 – Fotomicrografia mostrando linfócitos humanos normais e binucleados devido à adição de Citocalasina B na cultura, com aumento de 100x.
Fonte: Núcleo de Pesquisas Replicon, 2011.

O sistema imunitário adaptativo que inclui os linfócitos, é muito eficaz na defesa do organismo. Estas células apresentam características de memória, especificidade e reconhecimento de células que não pertencem ao sistema biológico do qual pertencem (ROITT *et al.*, 2003).

Os linfócitos são células diferenciadas, que normalmente não sofrem divisões, permanecendo no estágio de G0 da interfase. Considerando que os linfócitos humanos, quando coletados estão na fase G0, são ideais para avaliação de danos nesse estágio, mas ressalta-se que como as células são mais sensíveis aos efeitos genotóxicos durante as fases S, G2 e mitose, é também importante avaliar a ação do agente-teste quando a maioria das células estão se dividindo (SALVADORI *et al.*, 2003).

Aplicando o método de cultivo celular os testes citogenéticos podem ser desenvolvidos a partir da coleta de células do sangue periférico obtidas de animais ou indivíduos expostos a agentes mutagênicos e carcinogênicos (ABBAS *et al.*, 1995; LOHMANN, 1995). Os riscos e o nível de lesão em tecidos com tendência ao

desenvolvimento de câncer podem ser refletidos através do nível de dano em linfócitos, uma vez que os mecanismos de formação de danos cromossômicos podem ser similares em diferentes tecidos (ALBERTINI *et al.*, 2000).

A cultura de linfócitos é uma técnica simples e eficiente, pois não necessitam de manutenção e as células são de fácil obtenção, sendo, portanto, frequentemente utilizados como sistemas testes na avaliação de danos genéticos (CHEQUER, 2008). Segundo Suzuki (2003), a utilização de ensaios mutagênicos com células sanguíneas, em especial os linfócitos, apresenta vantagens como sua fácil obtenção por punção venosa, além de circular por todas as partes do corpo.

Miller *et al.* (1993) relatam que o método que utiliza a Citocalasina B para bloquear a polimerização de actina, inibindo a citocinese, permitindo a cariocinese normal, foi desenvolvido por Fenech e Morley (1985). Com a interferência da Citocalasina B, as células normais de linfócitos T apresentam a forma binucleada.

As células binucleadas no teste do micronúcleo com interferência da Citocalasina B representam células que sofreram uma divisão celular após o estímulo mutagênico, portanto sua análise permite uma contagem mais adequada e com maior precisão (LOHMANN, 1995).

Testes que avaliam genotoxicidade como o ensaio cometa e mutagenicidade como o teste do micronúcleo *in vivo* ou *in vitro*, são imprescindíveis na avaliação da segurança na utilização de substâncias advindas de plantas medicinais, pois segundo Aquino (2010), os diferentes testes possuem a capacidade de detectar compostos que induzem danos genéticos indiretos através da biotransformação ou até mesmo danos diretos através da metabolização. O autor ainda ressalta a importância de aliar testes *in vivo* e *in vitro* com a mesma substância a fim de verificar seus possíveis efeitos nesses sistemas como a existência de co-fatores na metabolização, ou se essas substâncias não precisam ser metabolizadas para que seu efeito ocorra.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Coleta e preparação do material botânico

Os espécimes de *Cochlospermum regium* foram coletados no Parque Municipal Serra das Areias, em Aparecida de Goiânia – Goiás, mediante autorização (Anexo B). O ponto geográfico das coletas encontram-se nas coordenadas S 16.83479° O 49.30820° e S 16.83476° O 49.30835°. As amostras foram identificadas pelo Professor Heleno Dias Ferreira e a exsicata encontra-se depositada no Herbário da Universidade Federal de Goiás sob o registro nº. 45.516, compondo a família *Bixaceae* (Figura 13), conforme Souza e Lorenzi (2008).

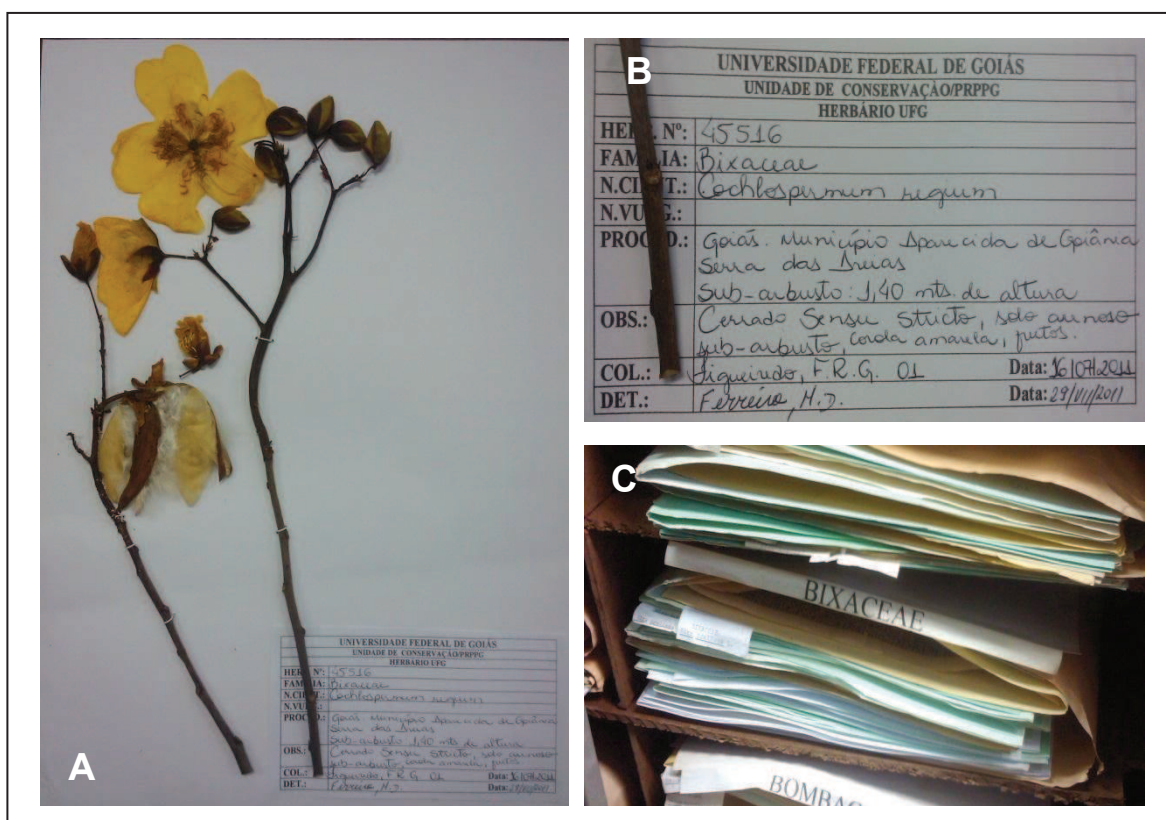


Figura 13 – Exsicata de *Cochlospermum regium* (Mart. et. Schr.) Pilger) (A); sua ficha de identificação e (C) família onde foi registrada.
Fonte: Acervo pessoal.

Foram coletadas 11 raízes, totalizando 25,2kg. O maior exemplar apresentou 6 kg, 54 cm de comprimento e 38 cm de diâmetro. Após a coleta, os rizomas foram lavados com água corrente e levados para o Núcleo de Pesquisas Replicon da Pontifícia Universidade Católica de Goiás, onde foram pesados, levemente descascados e fatiados em pedaços de <math>< 1\text{ cm}</math>. Os fragmentos foram secos em estufa a 40°C por 72h. Em seguida, foram triturados, produzindo 3,3kg de produto, que foi armazenado em ambiente seco e ao abrigo da luz (Figura 14).



Figura 14 – Etapas do processamento de raízes de *Cochlospermum regium* (Mart. et. Schr.) Pilger) coletadas no Cerrado Goiano em (A) total de raízes; (B) medição; (C) pesagem; (D) limpeza; (E, F) fragmentos; (G) trituradas e armazenada.

Fonte: Acervo pessoal.

O extrato foi preparado pela técnica de decocção, por 25 minutos em água aquecida à ebulição (Figura 15), sendo que ao final de todo o processo, o decocto foi filtrado usando-se uma bomba a vácuo. O filtrado foi utilizado para os testes logo após o seu preparo.



Figura 15 – Preparo do extrato de *Cochlospermum regium* (Mart. et. Schr.) Pilger).
Fonte: Acervo pessoal.

4.2 Testes em *Poecilia reticulata*

4.2.1 Teste de toxicidade aguda para determinação da $CL_{50/96h}$

O presente estudo foi realizado sob aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Reg. ANIMAL 001/2011 (Anexo C) conforme normas da Resolução nº 879 do CFMV e Lei nº 11794/08. A espécie *P. reticulata* foi identificada pela Dr^a. Nicelly Braudes Araújo do Centro de Biologia Aquática da PUC-GO. Os peixes utilizados foram previamente coletados no lago do Instituto Trópico Subúmido, da PUC-GO em Goiânia situado entre as coordenadas 16°44'11"S e 49°12'55"W. Foram selecionados peixes de idade aproximada de 60 dias, tamanho e peso. O volume de água para peixe seguiu o

recomendado pelo IBAMA, (1987), que consistiu em no máximo um grama de peixe para cada litro de água, aeração constante, temperatura de $22,7 \pm 1^\circ\text{C}$, média de pH $6,6 \pm 0,08$, temperatura ambiente de $23,6 \pm 1,3^\circ\text{C}$. Os peixes foram alimentados com ração comercial uma vez ao dia.

Foram coletados 150 animais, sendo 75 fêmeas e 75 machos, com média de peso de $0,65 \pm 0,29\text{g}$ e média de comprimento de $1,9 \pm 0,16\text{cm}$ entre os machos e peso de $0,255 \pm 0,07\text{g}$ e comprimento de $2,73 \pm 0,34\text{cm}$ entre as fêmeas. Para os testes foram utilizados 10 peixes para cada concentração e o controle negativo. A concentração inicial para a definição da $CL_{50/96h}$ foi de 50g.L^{-1} .

A $CL_{50/96h}$ do decocto de *C. regium* para *P. reticulata* foi determinada com o auxílio do software *Trimmedp Spearman-Kärber* versão 1.5 (Hamilton *et al.*, 1977), em $0,25\text{g.L}^{-1}$. As concentrações foram obtidas a partir da $CL_{50/96h}$ ($0,25\text{g.L}^{-1}$).

As concentrações administradas para a realização dos testes de Micronúcleo e Ensaio Cometa foram de $0,06\text{g.L}^{-1}$ (25%), $0,13\text{g.L}^{-1}$ (50%) $0,19\text{g.L}^{-1}$ (75%) e $0,25\text{g.L}^{-1}$ (100%) da CL_{50} do extrato aquoso de *C. regium*, e o controle negativo em lotes de 10 animais. O experimento foi conduzido em triplicatas por 96 horas (Figura 16).

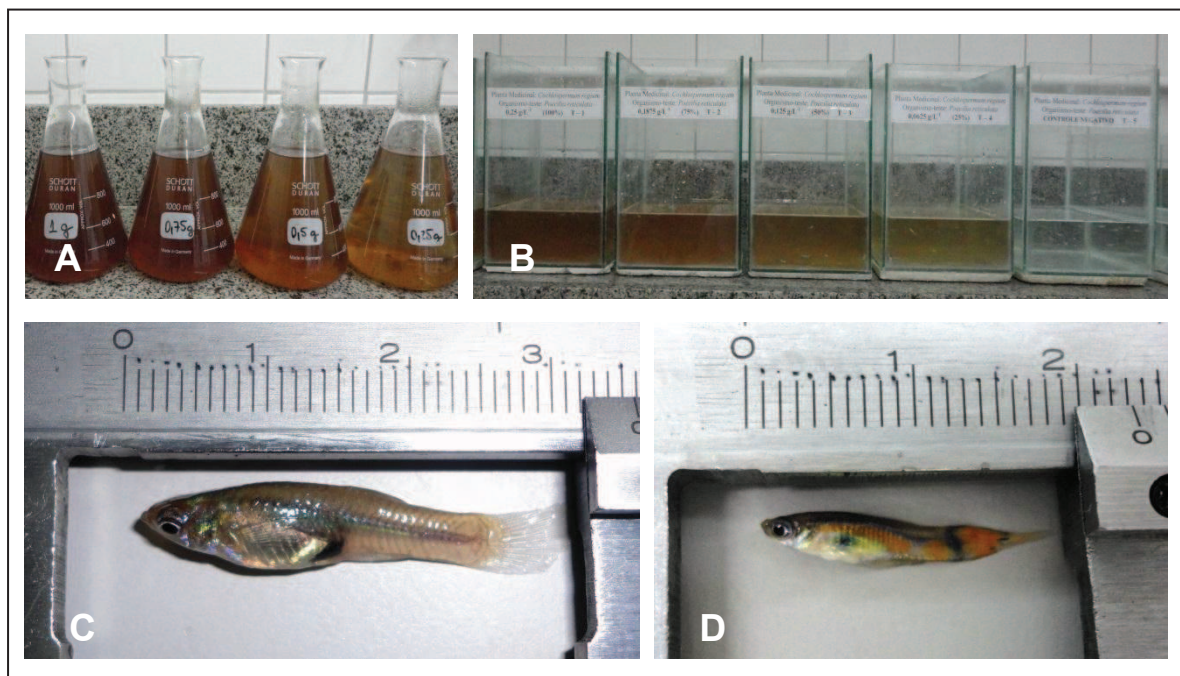


Figura 16 – Preparação dos extratos (A), para exposição em aquários padronizados (B); medição de *Poecilia reticulata* fêmea (C) e macho (D).

Fonte: Acervo pessoal.

4.2.2 Teste do Micronúcleo

A metodologia utilizada para a realização do teste do micronúcleo em peixes seguiu a técnica descrita por Heddle (1973), com modificações. Após exposição de 96 horas conforme concentrações definidas a partir da CL_{50} , os peixes foram eutanasiados para coleta das brânquias de 6 indivíduos por tratamento avaliado, sendo de 3 machos e 3 fêmeas. As amostras biológicas foram colocadas em tubos eppendorfs com 100 μ L de soro fetal bovino e homogeneizada. As lâminas foram preparadas pelo método de esfregação e colocadas para secar *overnight*. Após, elas foram fixadas em etanol absoluto e depois de secas foram coradas em solução de Giensa 8%.

As lâminas em duplicata previamente codificadas foram analisadas em teste cego, em microscópio óptico, com aumento de 1000 vezes. Os critérios para a seleção de células foram: células nucleadas (3000 por indivíduo, totalizando 18000 células por tratamento); núcleos intactos, com tamanhos aproximadamente iguais, mesmo padrão de coloração e limite citoplasmático definido: membrana celular intacta; célula claramente distinguível das células adjacentes. As características do micronúcleo avaliados consistem na morfologia idêntica à dos núcleos principais; diâmetro entre 1/16 até, no máximo, 1/3 dos núcleos principais; mesma coloração dos núcleos; não apresentar refringência; não estar ligado ou conectado a um dos núcleos principais, pode estar encostado, mas não sobreposto a um dos núcleos principais.

Os parâmetros considerados na análise foram: o número de células nucleadas analisadas; número total de micronúcleos nas células nucleadas; e as alterações eritrocíticas nucleares encontradas como núcleo em forma de rim e núcleo lobado.

4.2.3 Ensaio Cometa

Para realização do ensaio cometa o material foi coletado dos mesmos indivíduos do teste de micronúcleo, para evitar utilizar mais animais e repetir os

tratamentos. O protocolo realizado seguiu a técnica descrita por Singh *et al.* (1988), com modificações. Para realizar a técnica do ensaio cometa foram previamente preparadas lâminas de cobertura com agarose *normal point* (1,5%). A suspensão de eritrócitos foi homogeneizada com agarose *low melting point* e espalhadas na lâmina e cobertas com lamínula, condicionadas em refrigeradores durante 10 minutos. Após, as lamínulas foram retiradas cuidadosamente e as lâminas foram submersas em solução de lise no refrigerador a 4°C por 24 horas.

Decorridas as 24 horas, as lâminas foram depositadas organizadamente na cuba horizontal de eletroforese que estava mergulhada em gelo e adicionado o tampão de eletroforese em condições alcalinas (pH13) até cobrir as lâminas. O DNA foi deixado para desnaturar no tampão por 25 minutos; realizada a eletroforese a $1V.cm^{-1}$ a 300mA por 25 minutos; terminada a eletroforese as lâminas foram retiradas cuidadosamente e neutralizadas 3 vezes com TRIS a 0,4 M e pH 7,5 por 5 minutos. Depois de secas, as lâminas foram fixadas em etanol. Todos os procedimentos para o ensaio cometa foram realizados ao abrigo da luz.

Para a coloração das lâminas, foi utilizado brometo de etídeo. Ao se gotejar o brometo, uma lamínula era depositada sobre o material e as lâminas foram analisadas imediatamente. As imagens foram capturadas utilizando-se vídeo-microscopia de epifluorescência Axioplan-Imaging® (Carl Zeiss, Alemanha) com auxílio de uma objetiva de 10x utilizando-se o software *Isis*®. Foram analisados 50 nucleóides por lâmina em duplicata (100 por indivíduo e 600 por tratamento) e o nível de dano ao DNA foi calculado usando-se o software *Cometscore*® (versão 1.5), utilizando como parâmetros o tamanho da cauda do cometa e a quantidade de DNA na cauda do cometa.

4.3 Testes em linfócitos humanos

4.3.1 Determinação da $CL_{50/96h}$

O presente trabalho foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Pontifícia Universidade Católica de Goiás, registro nº 0007.0.168.000-11 e dispensado da avaliação conforme Resolução 196/96 (Anexo D).

Para os ensaios realizados com linfócitos, o sangue periférico foi coletado de 4 indivíduos voluntários e saudáveis de 20 a 40 anos, sendo 2 homens e 2 mulheres, que não faziam uso de medicamentos, nem de drogas lícitas ou ilícitas. As culturas foram realizadas imediatamente à coleta.

Para determinar a $CI_{50/96h}$ de linfócitos humanos foram realizadas culturas contendo RPMI, soro fetal bovino, sangue total e administrada várias concentrações do extrato de *C. regium* e controle negativo, por períodos de 96 horas (Figura 17). A concentração inicial foi de $50g.L^{-1}$. As lâminas foram coradas com azul de tripan e a contagem de células viáveis foram contadas pela leitura em Câmara de Neubauer.

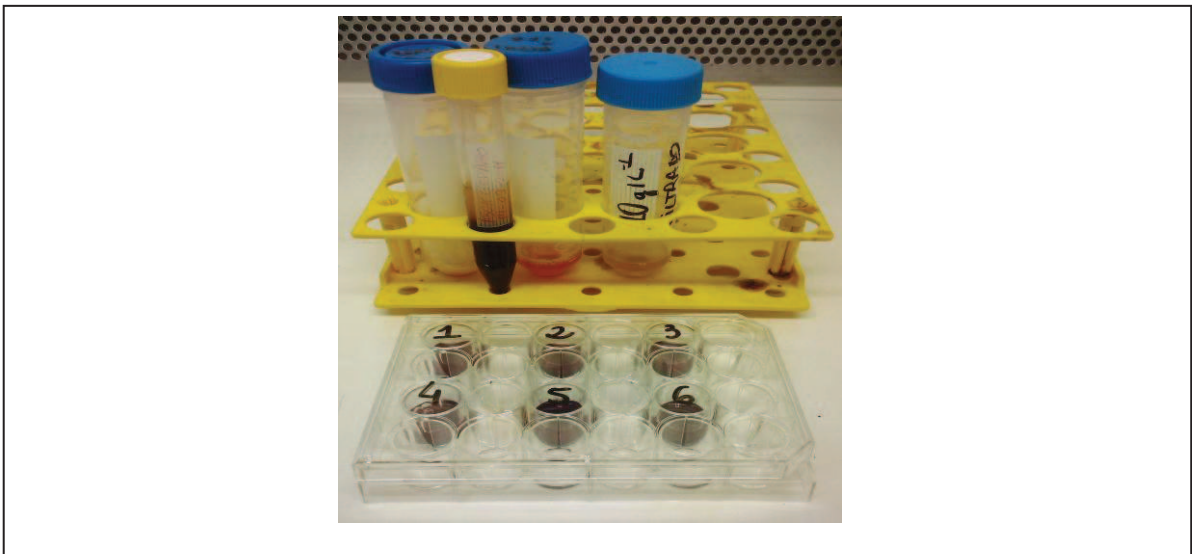


Figura 17 – Materiais utilizados para preparação das culturas completas de linfócitos humanos com o decocto de *Cochlospermum regium*.
Fonte: Acervo pessoal.

A $CI_{50/96h}$ do decocto de *C. regium* definida para linfócitos humanos para um período de 96 horas foi de $1,73g.L^{-1}$.

4.3.2 Teste do Micronúcleo

Para realizar o teste de micronúcleo foram utilizadas quatro concentrações da $CL_{50/96h}$, sendo $1,73g.L^{-1}$ correspondente a 100%, $1,29g.L^{-1}$ (75%), $0,86g.L^{-1}$ (50%) e $0,43g.L^{-1}$ (25%). Para controle positivo foi utilizado uma concentração de $80\mu M$ de MMS (metil-metanosulfonato), por ser um conhecido agente alquilante de bases do

DNA. O protocolo seguiu a adaptação da técnica para obtenção de micronúcleo em linfócitos binucleados de da Cruz *et al.* (1994).

As culturas foram preparadas com meio completo para linfócitos, com RPMI, soro fetal bovino, L-glutamina e fitohemaglutinina, e armazenadas em estufa a 37°C / 5% CO₂ por 24 horas. Após as primeiras 24 horas de aclimação da cultura, o extrato de *C. regium* foi adicionado seguindo as concentrações determinadas e também o MMS. Em 44 horas foi adicionado citocalasina B em concentração de 5µg.mL⁻¹. Com 72 horas a cultura foi transferida para um tubo cônico e centrifugada a 1000rpm por 10 minutos, desprezado-se o sobrenadante e acrescentado a solução de KCl a 0,075M. Após, foram fixadas com solução de Carnoy até as amostras ficarem limpas. As lâminas foram preparadas pelo método de gotejamento. Depois de secas foram coradas com solução de Giensa 4% e protegidas com lamínulas fixadas com bálsamo do Canadá. Foram preparadas quatro lâminas por tratamento, analisadas em teste cego, em microscópio óptico de luz, com aumento de 400 vezes.

Os critérios para a seleção de células foram: células binucleadas (1000 células por lâmina, 4000 por tratamento); núcleos intactos, com tamanhos aproximadamente iguais, mesmo padrão de coloração e dentro do limite citoplasmático: membrana celular intacta; célula claramente distinguível das células adjacentes.

4.3.3 Ensaio Cometa

Para o ensaio cometa, foi coletado sangue periférico. Como controle negativo foi usado somente a cultura completa. Para o controle positivo as células foram expostas em cultura ao MMS na concentração de 70µM. As concentrações de *C. regium* foram 1,73g.L⁻¹ (100%), 1,29g.L⁻¹ (75%), 0,86g.L⁻¹ (50%) e 0,43g.L⁻¹ (25%) da CL₅₀ para linfócitos. O tempo de cultura para a realização deste teste foi de 3 horas de exposição. A metodologia utilizada foi a descrita por Singh *et al.* (1988), com modificações.

Para realizar a técnica do ensaio cometa foram previamente preparadas lâminas de cobertura com agarose (1,5%). A suspensão de linfócitos foi

homogeneizada com agarose baixo ponto de fusão e espalhadas na lâmina e cobertas com lamínula, condicionadas em refrigerador durante 10 minutos; após, as lamínulas foram retiradas cuidadosamente e as lâminas foram submersas em solução de lise no refrigerador a 4°C por 24 horas.

Após as 24 horas, as lâminas foram depositadas na cuba horizontal de eletroforese, mergulhada em gelo, e adicionado o tampão de eletroforese até cobrir as lâminas. O DNA foi desnaturando em tampão alcalino (pH13) por 25 minutos; a eletroforese transcorreu a $1V.cm^{-1}$ a 300mA por 25 minutos; terminada a eletroforese as lâminas foram retiradas cuidadosamente e neutralizadas por 3 vezes de 5 minutos com TRIS a 0,4 M e ph 7,5. e depois de secas as lâminas foram fixadas com etanol por 5 minutos. Todos os procedimentos do ensaio cometa ocorreram ao abrigo da luz.

Foram coradas com brometo de etídeo e coberta com lamínula e analisadas imediatamente, sendo que as imagens foram capturadas utilizando vídeo-microscopia de epifluorescência Axioplan-Imaging® (Carl Zeiss, Alemanha) em objetiva de 10x utilizando o software *Isis*®. Foram analisados 50 nucleóides por lâmina em duplicata (100 por tratamento); os parâmetros avaliados foram comprimento da cauda do cometa e quantidade de DNA na cauda do cometa, e calculado o nível de dano ao DNA usando o *software Cometscore*® (versão 1.5).

4.4 Análise Estatística

Para a realização da análise estatística os resultados foram expressos como médias \pm desvio padrão, utilizando-se o *software BioEstat 5.0*. Para a determinação dos testes estatísticos adequados foi inicialmente realizado o teste de normalidade Kolmogorv-Smirnov. Os resultados de micronúcleo apresentaram distribuição normal (valor de $p \geq 0,05$), portanto foi realizado o teste paramétrico de análise de variância (ANOVA) seguido do Teste de Tukey e posterior realização do teste de correlação de Pearson e teste de regressão linear simples. Já os resultados do ensaio cometa não apresentaram distribuição normal (valor de $p < 0,01$), portanto foi realizado o teste não paramétrico de análise de variância (Kruskall-Wallis) seguido do Teste de Dunn e posterior realização do teste de correlação de Spearman e teste de

regressão linear simples. Em todas as análises foi considerado um nível de significância de 95% ($p \leq 0,05$).

5 RESULTADOS

5.1 *Poecilia reticulata*

5.1.1 CL_{50/96h}

Conforme normas do IBAMA (1987), nos experimentos realizados para a determinação da CL_{50/96h} deste estudo, foram considerados válidos, pois a média de mortalidade do grupo controle (0g.L⁻¹) nos testes não ultrapassou 10%.

Os resultados obtidos sobre a determinação da CL₅₀ do decocto de *Cochlospermum regium* (Mart. & Schr.) Pilg.) – (Bixaceae) em *Poecilia reticulata* por período de 96 horas foi de 0,25g.L⁻¹ ou 250mg.L⁻¹, variando entre 0,23g.L⁻¹ (mínimo) e 0,27g.L⁻¹ (máximo).

5.1.2 Teste do Micronúcleo

Para a realização do teste do micronúcleo em *P. reticulata* com decocto de *C. regium* foram analisadas 90.000 células (18000 células/tratamento, 3000 células/indivíduo) com total de 110 micronúcleos encontrados (Figura 18).

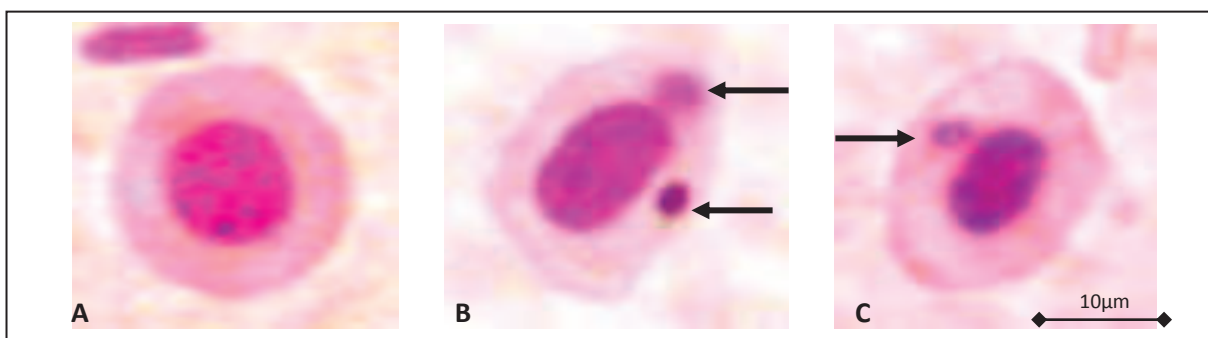


Figura 18 – Eritrócitos de *Poecilia reticulata* mononuclear (A) e com presença de micronúcleo (B e C), com aumento de 100x.

Fonte: Núcleo de Pesquisas Replicon, 2011.

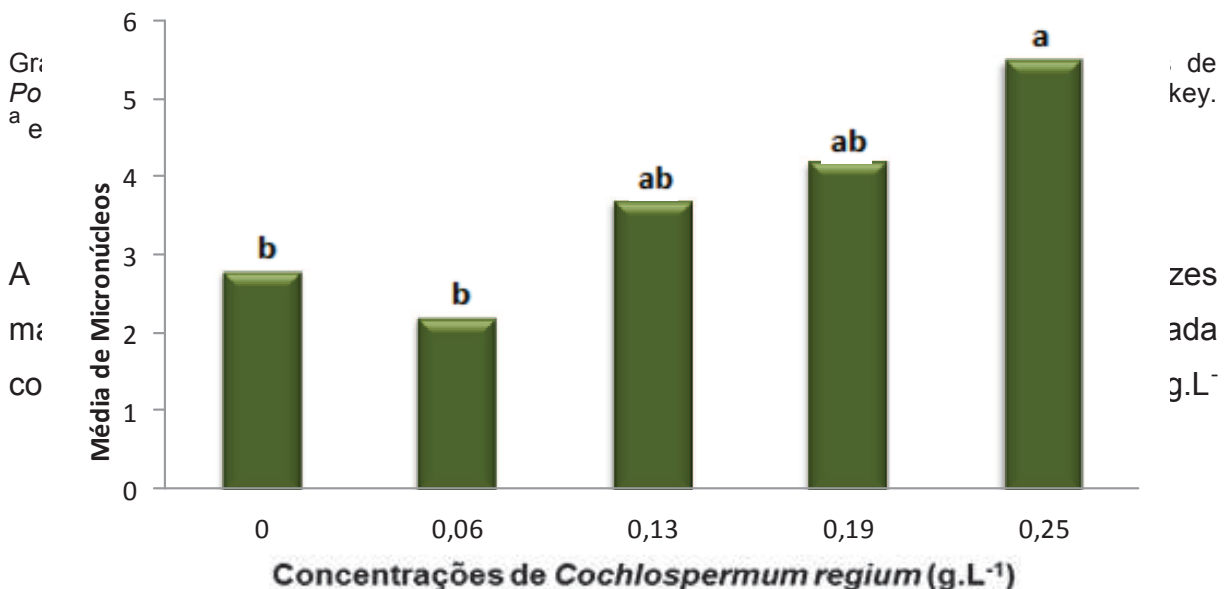
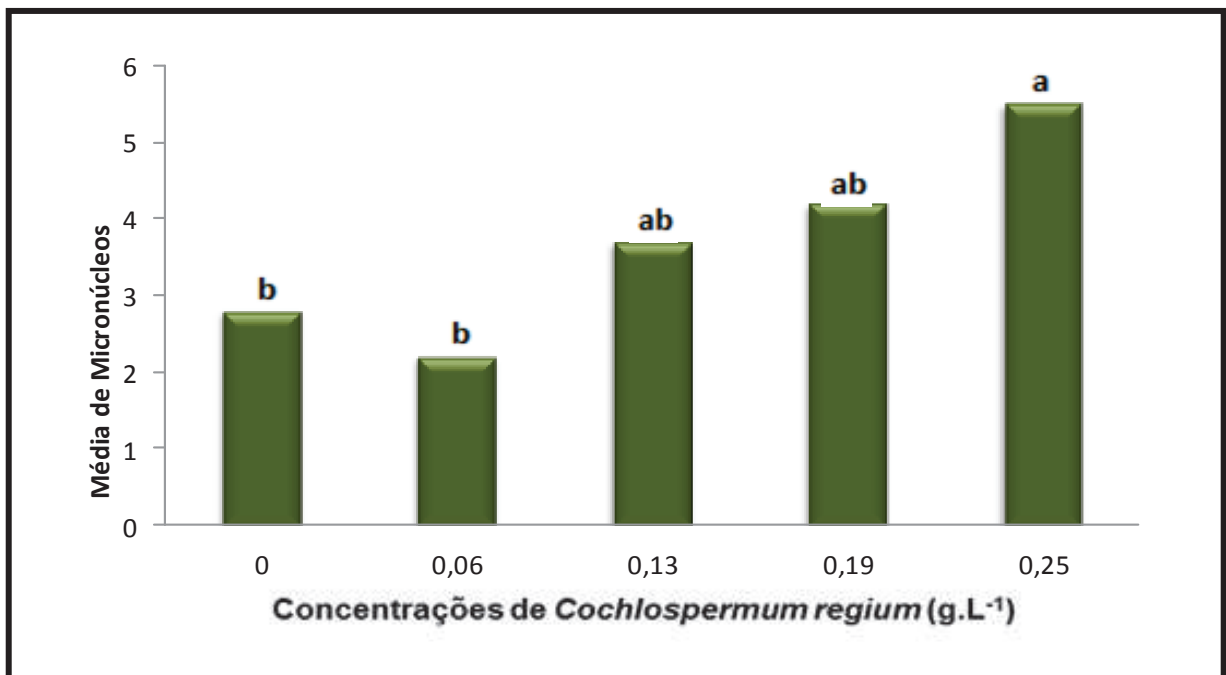
A Tabela 4 apresenta os resultados referentes ao teste do micronúcleo em eritrócitos de *P. reticulata*, observados a cada 3.000 células avaliadas de 6 indivíduos

analisados em cada tratamento. E o Gráfico 1 ilustra a média de micronúcleos referentes a cada tratamento.

Tabela 4 – Resultados do teste do micronúcleo em eritrócitos de *Poecilia reticulata* de acordo com as concentrações administradas do decocto de *Cochlospermum regium*.

| Concentração g.L ⁻¹ | $\bar{x} \pm S$ (MN/3000) | Total de células analisadas | Total de Micronúcleos |
|-----------------------------------|------------------------------|--------------------------------|--------------------------|
| 0,25 | 5,5 ± 1,5 ^a | 18000 | 33 |
| 0,19 | 4,2 ± 1,2 ^{ab} | 18000 | 25 |
| 0,13 | 3,7 ± 2 ^{ab} | 18000 | 22 |
| 0,06 | 2,2 ± 0,8 ^{b**} | 18000 | 13 |
| 0 | 2,8 ± 1,3 ^{b*} | 18000 | 17 |

^a e ^b resultados do teste de Tukey. * diferença significativa (p<0,05) e ** diferença muito significativa (p<0,01) em relação ao tratamento de 0,25g.L⁻¹. \bar{x} símbolo da média e S símbolo do desvio padrão.



¹ (2,2±0,8). Indicando que a concentração de 0,25g.L⁻¹ de *C. regium* é mutagênica *in vivo* no sistema de *P. reticulata*.

Não foi observada diferença entre as médias de micronúcleos para os tratamentos de 0,06g.L⁻¹ (2,8±1,3); 0,13g.L⁻¹ (3,7±2) e 0,19g.L⁻¹ (4,2±1,2) em relação à média do controle negativo (2,8±1,3).

Assim como não houve diferença entre a maior concentração de *C. regium* 0,25g.L⁻¹ (5,5±1,5) com as médias apresentadas pelas concentrações de 0,13g.L⁻¹ (3,7±2) e 0,19g.L⁻¹ (4,2±1,2).

Como as médias das concentrações de 0,13g.L⁻¹ e 0,19g.L⁻¹ oscilaram entre a e b conforme resultados do teste de Tukey, estas concentrações podem apresentar mutagenicidade.

Houve forte correlação positiva com p=0,023 e r=0,9279 entre as concentrações dos tratamentos e média de micronúcleos observados.

A regressão linear simples também foi positiva e apresentou p=0,0212 e R²=0,8146 entre as concentrações dos tratamentos e média de micronúcleos observados. O Gráfico 2 expressa os resultados referentes ao teste de regressão linear simples.

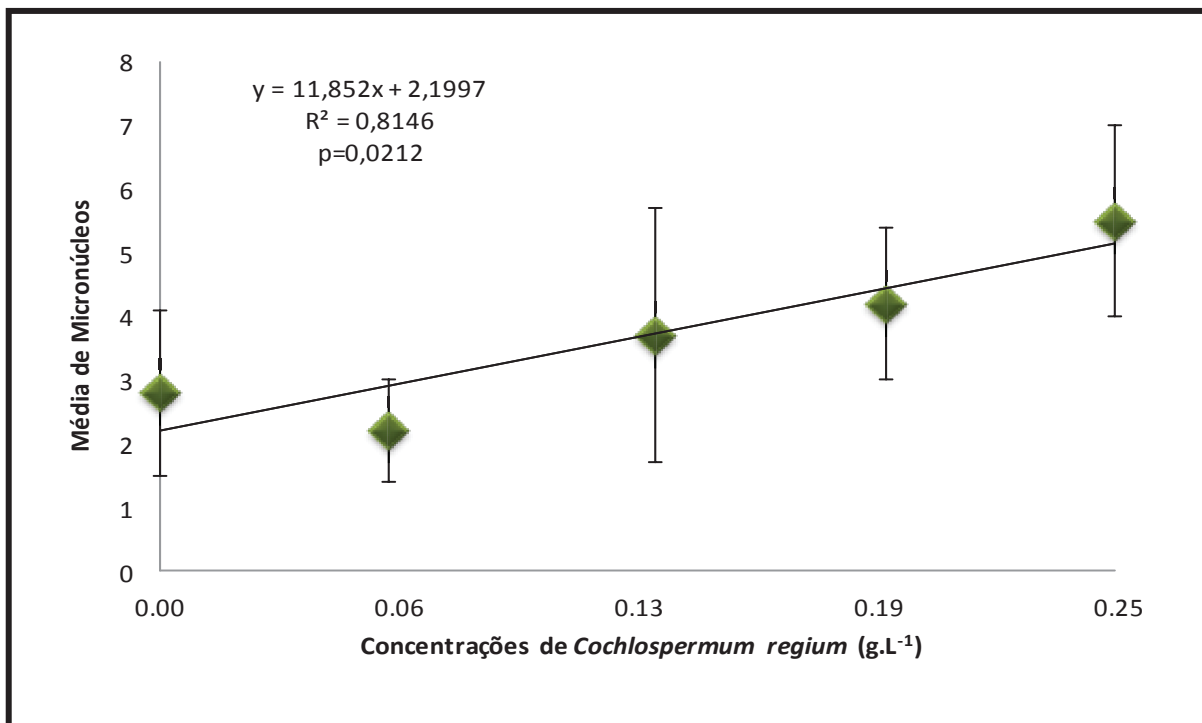


Gráfico 2 – Análise de regressão linear simples entre as concentrações do decocto de *Cochlospermum regium* e as médias de micronúcleos observados em eritrócitos de *Poecilia reticulata*.

5.1.3 Alterações eritrocíticas nucleares (AENs)

Na avaliação das AENs foram encontrados núcleos reniformes (K) e núcleos lobados (L). Dentre as 90000 células analisadas (18000 células/tratamento, 3000 células/indivíduo) para o teste do micronúcleo em *P. reticulata*, não foram encontradas células binucleadas nem células com núcleo segmentado.

Exemplos de eritrócitos com núcleo reniforme (K) e lobados (L) observados em *P. reticulata* expostos às diferentes concentrações do decocto de *C. regium* estão apresentados na Figura 19.

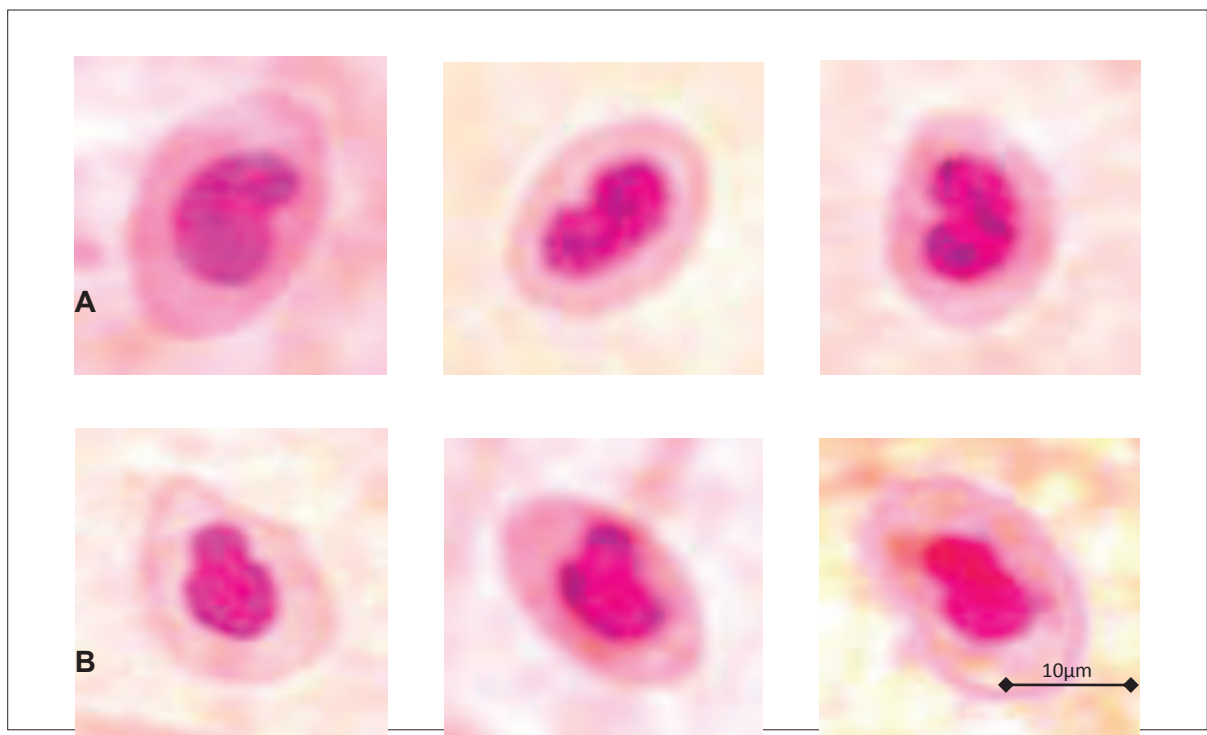


Figura 19 – Eritrócitos de *Poecilia reticulata* apresentando AENs com núcleo em forma de rim (K)(A) e lobadas (L)(B), com aumento de 100x.

Fonte: Núcleo de Pesquisas Replicon, 2011.

A Tabela 5 e Gráfico 3 apresentam as médias das AENs com núcleos reniformes e lobados de acordo com as concentrações de *C. regium* para o teste do micronúcleo em *P. reticulata*, observados a cada 3.000 células avaliadas de 6 indivíduos analisados em cada tratamento.

Tabela 5 – Resultados das Alterações Eritrocíticas Nucleares em forma de Rim (K) e lobadas (L) encontradas em eritrócitos de *Poecilia reticulata* de acordo com as concentrações administradas do decocto de *Cochlospermum regium*.

| Concentração g.L ⁻¹ | $\bar{x} \pm S$ (AENs/3000) | Total de células analisadas | Total de AENs (K) | Total de AENs (L) | Total de AENs (K e L) |
|--------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-------------------|-------------------|-----------------------|
| 0,25 | 5,6 ± 2,2 ^a | 18000 | 42 | 25 | 67 |
| 0,19 | 4,9 ± 2,6 ^{ab} | 18000 | 39 | 20 | 59 |
| 0,13 | 3,3 ± 1,7 ^{ab} | 18000 | 27 | 13 | 40 |
| 0,06 | 2,5 ± 1,4 ^{b**} | 18000 | 20 | 10 | 30 |
| 0 | 2,7 ± 1,6 ^{b**} | 18000 | 18 | 14 | 32 |

^a e ^b resultados do teste de Tukey. * diferença significativa (p<0,05) e ** diferença muito significativa (p<0,01) em relação ao tratamento de 0,25 g.L⁻¹. \bar{x} símbolo da média e *S* símbolo do desvio padrão.

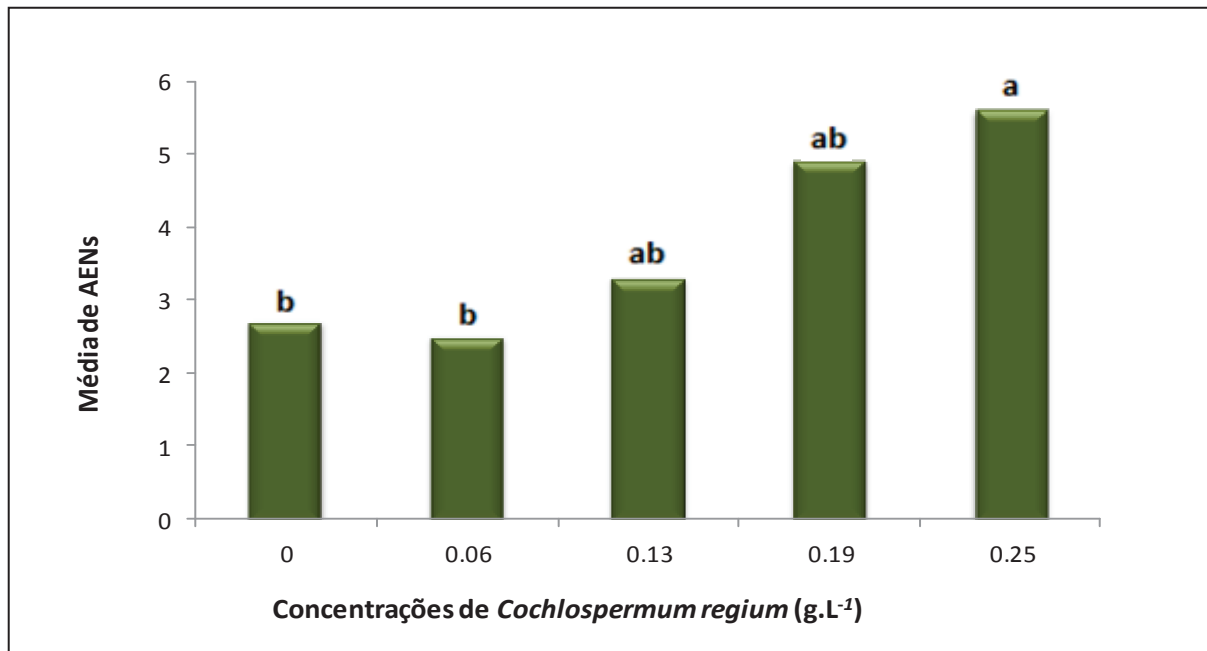


Gráfico 3 – Ilustração das médias das AENs e resultados de Tukey com núcleos reniformes e lobados de acordo com as concentrações de *Cochlospermum regium* para o teste do micronúcleo em *Poecilia reticulata*. ^a e ^b resultados do teste de Tukey.

A média das AENs (eritrócitos com núcleos reniformes e lobados) observada em eritrócitos de *P. reticulata* foi 2,1 vezes maior (p=0,0007) para a concentração de 0,25g.L⁻¹ (5,6±2,2), quando comparada com a média do controle negativo (2,7±1,6) e com a média do tratamento de 0,06g.L⁻¹ (2,5 ± 1,4). A concentração de 0,25g.L⁻¹ demonstrou efeito citotóxico.

Não foi observada diferença entre as médias das AENs para os tratamentos de 0,06g.L⁻¹ (2,5 ± 1,4); 0,13g.L⁻¹ (3,3 ± 1,7) e 0,19g.L⁻¹ (4,9 ± 2,6) em relação

à média do controle negativo ($2,7 \pm 1,6$).

As médias das concentrações de $0,13 \text{g.L}^{-1}$ e $0,19 \text{g.L}^{-1}$ também oscilaram entre a e b, para os resultados do teste de Tukey, demonstrando que ambas podem apresentar citotoxicidade.

Houve forte correlação positiva $p=0,0178$ e $r=0,9392$ entre as concentrações dos tratamentos e média de eritrócitos com núcleos reniformes e lobados de *P. reticulata*. O Gráfico 4 indica regressão linear positiva com $p=0,0161$ e $R^2=0,8424$ também entre as concentrações do decocto de *C. regium* e os danos observados.

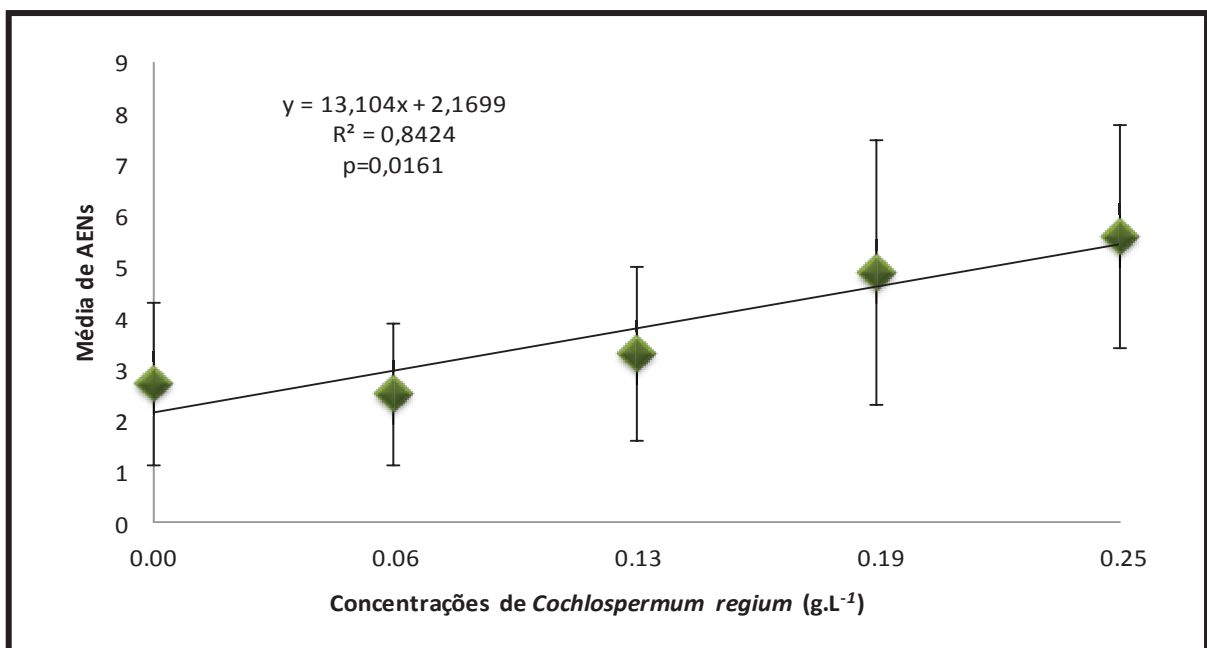


Gráfico 4 – Análise de regressão linear simples entre as concentrações do decocto de *Cochlospermum regium* e as médias das AENs com núcleos reniformes (K) e lobados (L) observados em eritrócitos de *Poecilia reticulata*.

5.1.4 Ensaio Cometa

Os parâmetros utilizados para o teste do cometa para o cálculo do nível de dano no DNA foram o comprimento da cauda do cometa e do DNA na cauda do cometa, com análise de 600 células individualizadas por tratamento.

A Figura 20 mostra imagens de células individualizadas de *Poecilia reticulata* coradas com Brometo de Etídeo e capturadas utilizando-se microscópio de

epifluorescência e o software *Isis*[®].

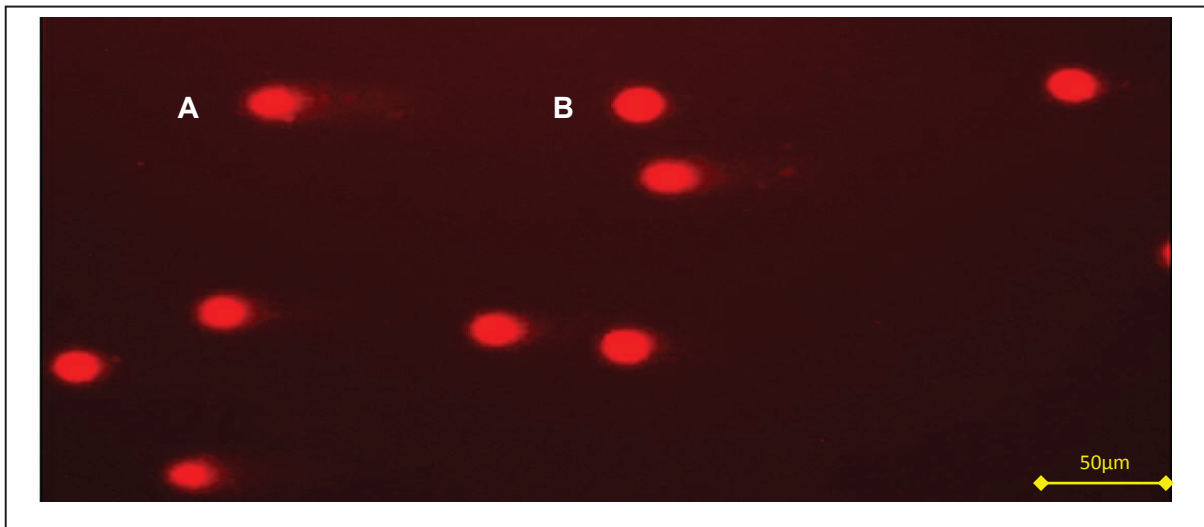


Figura 20 – Imagens de nucleóides individualizados de *Poecilia reticulata* mostrando nucleóides com a presença de cauda (A) e sem cauda (B) que foram avaliadas pelo software *CometScore*[®] versão 1.5.

Fonte: Núcleo de Pesquisas Replicon, 2011.

A Tabela 6 apresenta as médias obtidas a partir de eritrócitos de *P. reticulata* para o parâmetro comprimento da cauda do cometa conforme a concentração do decocto de *C. regium*.

Tabela 6 – Resultados das médias para o parâmetro comprimento da cauda do cometa com as concentrações utilizadas em *Poecilia reticulata*.

| Concentração g.L ⁻¹ | Comprimento da cauda do cometa (U.A.) | Total de células analisadas |
|--------------------------------|---------------------------------------|-----------------------------|
| | $\bar{x} \pm S$ | |
| 0,25 | 0,33 ± 0,05 | 600 |
| 0,19 | 0,24 ± 0,04 | 600 |
| 0,13 | 0,25 ± 0,07 | 600 |
| 0,06 | 0,25 ± 0,03 | 600 |
| 0 | 0,31 ± 0,05 | 600 |

Teste Kruskal-Wallis ($p > 0,05$). (U.A.) Unidade Arbitrária. \bar{x} símbolo da média e S símbolo do desvio padrão.

Considerando o parâmetro de comprimento da cauda, não foi observada diferença ($p = 0,6289$) entre as médias obtidas nos eritrócitos de *P. reticulata* expostos às

diferentes concentrações do decocto de *Cochlospermum regium* com a média do controle negativo.

Não foi observado correlação significativa ($p=0,9347$) entre as concentrações avaliadas com os resultados obtidos. O teste de regressão linear também não apontou resultado significativo ($p=0,8593$).

A Tabela 7 apresenta as médias obtidas a partir de eritrócitos de *P. reticulata* para o parâmetro quantidade de DNA na cauda do cometa conforme a concentração do decocto de *C. regium*.

Tabela 7 – Resultados observados em nucleóides de *Poecilia reticulata* para o parâmetro quantidade de DNA na cauda do cometa conforme concentrações do decocto de *Cochlospermum regium* avaliadas.

| Concentração g.L ⁻¹ | Quantidade de DNA na cauda do cometa (U.A.) | Total de células analisadas |
|--------------------------------|---|-----------------------------|
| | $\bar{x} \pm S$ | |
| 0,25 | 0,024 \pm 0,003 | 600 |
| 0,19 | 0,019 \pm 0,001 | 600 |
| 0,13 | 0,021 \pm 0,04 | 600 |
| 0,06 | 0,021 \pm 0,002 | 600 |
| 0 | 0,022 \pm 0,003 | 600 |

Teste Kruskal-Wallis ($p>0,05$). (U.A.) Unidade Arbitrária. \bar{x} símbolo da média e S símbolo do desvio padrão.

Na avaliação para quantidade de DNA na cauda do cometa, também não foi observado diferença ($p=0,7677$) entre as médias dos tratamentos quando comparadas com o grupo controle. Assim como não houve correlação ($p=0,9347$) nem regressão linear ($p=0,7867$) significativas entre as concentrações do decocto de *C. regium* administradas com as médias de danos observados em nucleóides de *P. reticulata*.

Conforme resultados apresentados para o teste do cometa em nucleóides de *P. reticulata*, as concentrações do decocto de *C. regium* não exibiram efeito genotóxico.

5.2 Linfócitos humanos

5.2.1 CL_{50/96h}

A CL_{50/96h} do decocto de *Cochlospermum regium* (Mart. & Schr.) Pilg.) – (Bixaceae) em linfócitos humanos foi estimada em 1,73g.L⁻¹.

5.2.2 Teste do Micronúcleo

Para a realização do teste do micronúcleo em linfócitos T humanos binucleados com decocto de *C. regium* foram analisadas 24.000 células binucleadas do sangue periférico humano, sendo observados um total de 25 micronúcleos. A Figura 21 ilustra os exemplos de linfócitos binucleados observados neste estudo.

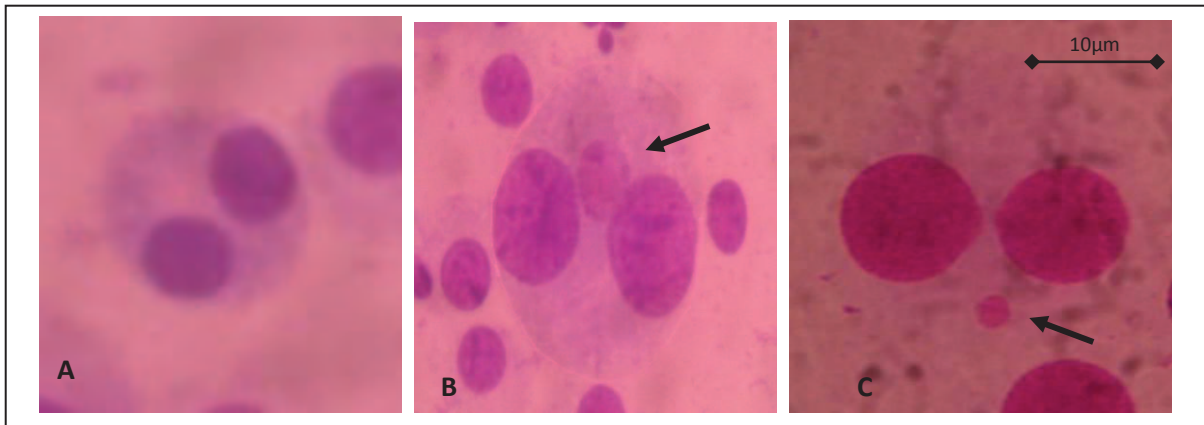


Figura 21 – Linfócitos T humanos binucleados (A) normal e com presença de micronúcleo (B e C), com aumento de 100x.

Fonte: Núcleo de Pesquisas Replicon, 2011.

A Tabela 8 e Gráfico 5 apresentam os resultados referentes ao teste de micronúcleos em linfócitos T humanos binucleados.

Tabela 8 – Micronúcleos encontrados de acordo com as concentrações administradas de *Cochlospermum regium* para o teste do micronúcleo em linfócitos T humanos binucleados.

| Concentração g.L ⁻¹ | $\bar{x} \pm S$ (MN/1000) | Total de células analisadas | Total de Micronúcleos |
|--------------------------------|------------------------------|--------------------------------|--------------------------|
| 1,73 | $1 \pm 0,8^{b^*}$ | 4000 | 4 |
| 1,29 | $0,75 \pm 1^{b^{**}}$ | 4000 | 3 |
| 0,86 | $0,75 \pm 0,5^{b^{**}}$ | 4000 | 3 |
| 0,43 | $0,5 \pm 0,6^{b^{**}}$ | 4000 | 2 |
| 0 | $0,25 \pm 0,5^{b^{**}}$ | 4000 | 1 |
| CP | $3 \pm 0,8^a$ | 4000 | 12 |

^a e ^b resultados do teste de Tukey. *P < 0,05 e **P < 0,01 Diferença significativa em relação ao Controle positivo (Teste de Tukey considerados significativos p < 0,05). \bar{x} símbolo da média e S símbolo do desvio padrão.

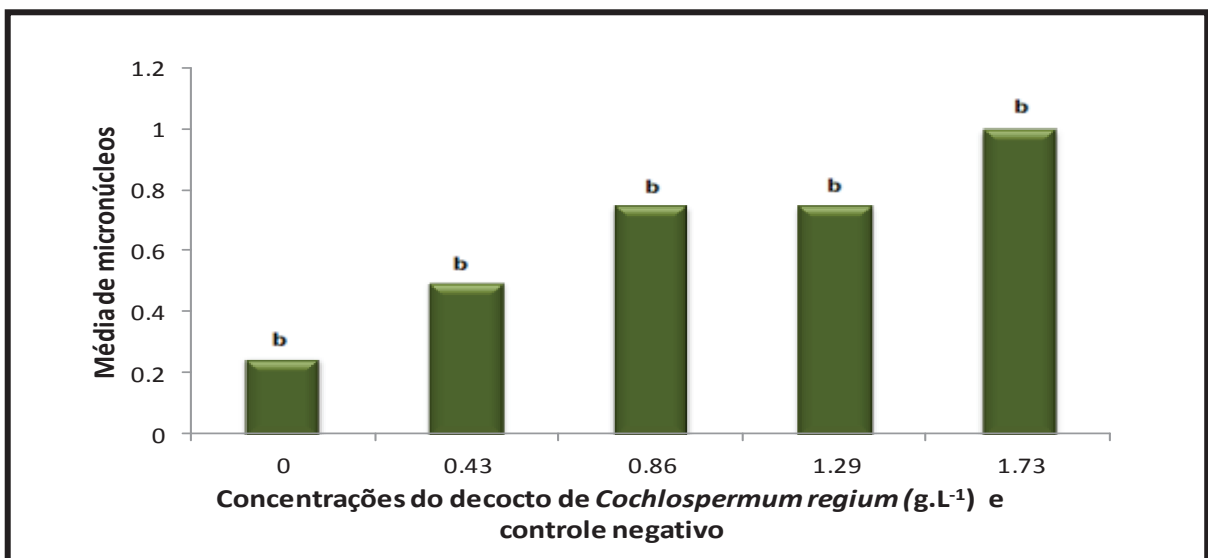


Gráfico 5 – Resultados de média de micronúcleos observados em linfócitos T humanos binucleados e teste de Tukey conforme concentrações avaliadas. ^a e ^b resultados do teste de Tukey.

A média de micronúcleos observada em linfócitos T humanos binucleados expostos às diferentes concentrações do decocto de *C. regium* não apresentou diferença ($p=0,6235$) quando comparada à média do controle negativo.

Contudo, houve forte correlação positiva ($p=0,006$ e $r=0,9707$) e regressão linear significativa ($p=0,005$ e $r=0,923$) entre as concentrações dos tratamentos do decocto de *C. regium* e média de micronúcleos observados em linfócitos humanos binucleados conforme indica o Gráfico 6.

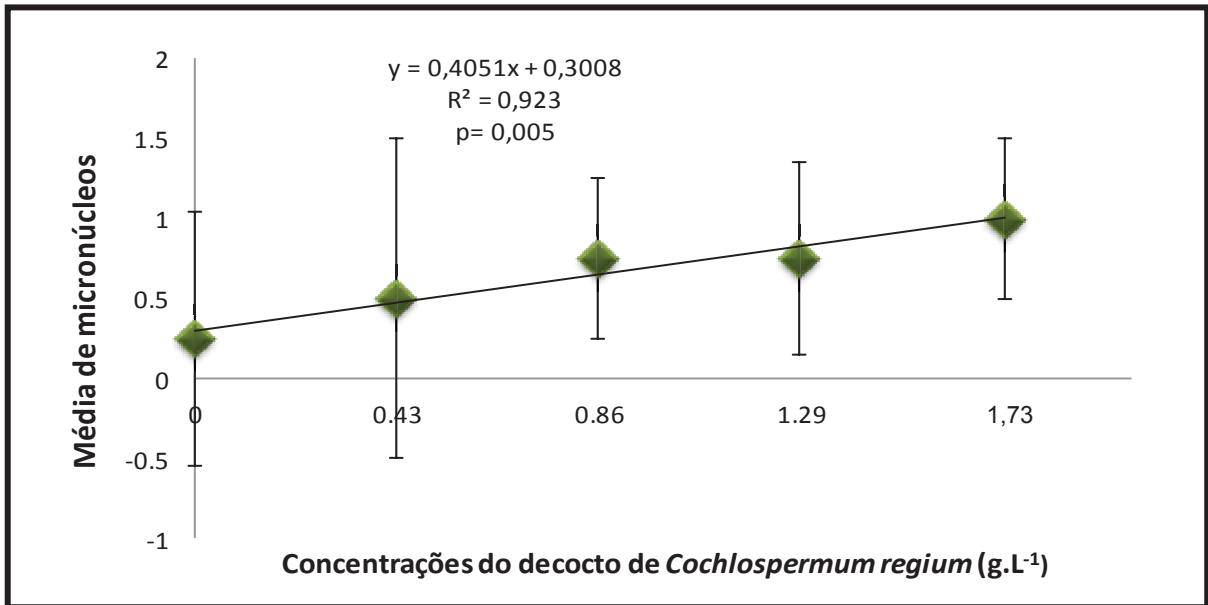


Gráfico 6 – Análise de regressão linear simples entre as concentrações do decocto de *Cochlospermum regium* e as médias de micronúcleos encontrados em linfócitos T humanos binucleados.

5.2.3 Ensaio Cometa

A Figura 22 mostra imagens de nucleóides individualizados analisados neste estudo.

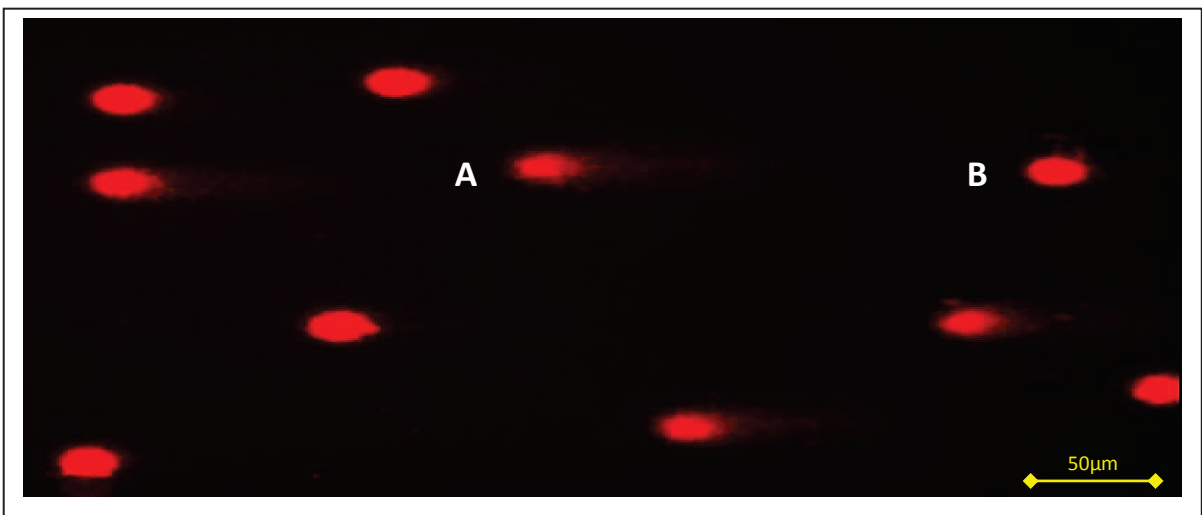


Figura 22 – Imagens de células individualizadas de linfócitos T humanos mostrando nucleóides com a presença de cauda (A) e sem cauda (B), avaliados pelo *Software CometScore*® versão 1.5. Fonte: Núcleo de Pesquisas Replicon, 2011.

Considerando o parâmetro comprimento da cauda do cometa, foi observada

diferença ($p < 0,0001$) entre as médias obtidas em Linfócitos humanos expostos às diferentes concentrações do decocto de *Cochlospermum regium* com a média do controle negativo. A Tabela 9 e Gráfico 7 apresentam as médias obtidas a partir dos nucleóides avaliados.

Tabela 9 – Relação entre as concentrações utilizadas em linfócitos T humanos, demonstrando que houve diferença conforme resultados do Teste de Dunn entre as médias apresentadas para o parâmetro comprimento da cauda do cometa.

| Concentração g.L ⁻¹ | Comprimento da Cauda do Cometa (U.A.) | Total de células analisadas |
|--------------------------------|---------------------------------------|-----------------------------|
| | $\bar{x} \pm S$ | |
| 1,73 | $3,98 \pm 0,46^b$ | 100 |
| 1,29 | $1,83 \pm 0,27^{bc}$ | 100 |
| 0,86 | $1,66 \pm 0,20^{bc}$ | 100 |
| 0,43 | $1,62 \pm 0,21^{bc}$ | 100 |
| 0 | $0,69 \pm 0,13^{bc}$ | 100 |
| CP | $32,04 \pm 2,86^a$ | 100 |

(U.A.) Unidade Arbitraria. ^a, ^b e ^c resultados do teste Kruskal-Wallis seguido pelo Teste de Dunn ($p < 0,05$). \bar{x} símbolo da média e S símbolo do desvio padrão.

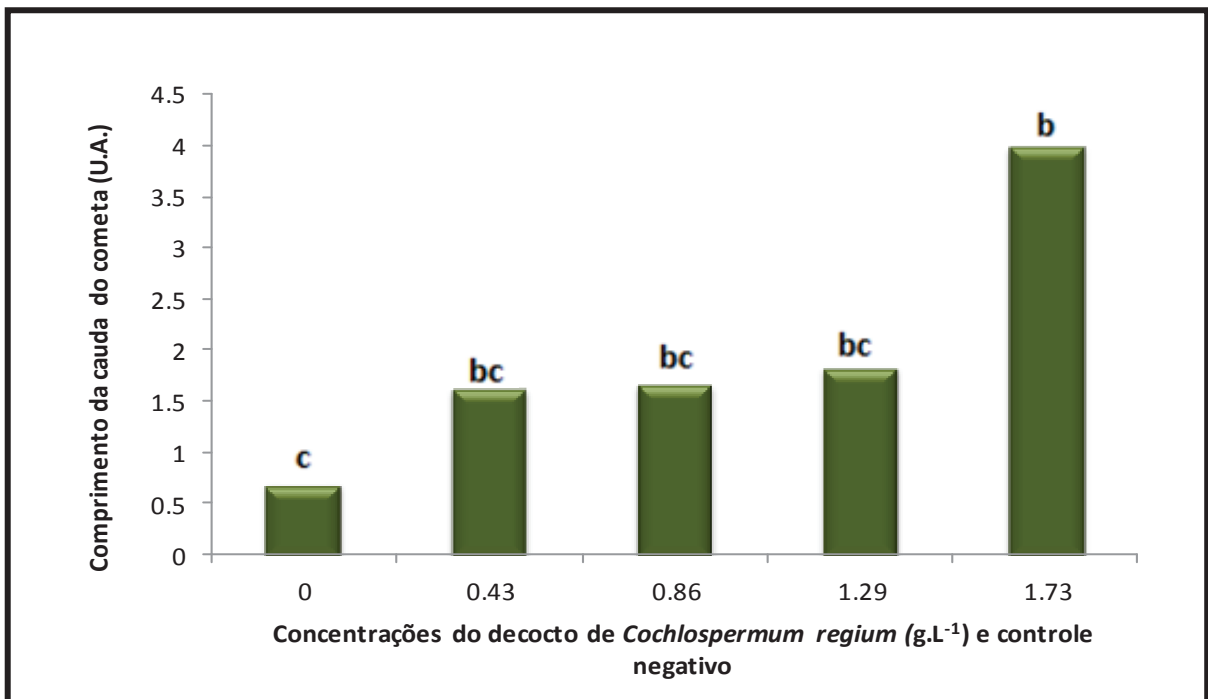


Gráfico 7 – Relação entre as concentrações utilizadas em linfócitos T humanos, demonstrando que houve diferença conforme resultados do Teste de Dunn entre as médias apresentadas para o parâmetro comprimento da cauda do cometa. ^a e ^{b,c} resultados do teste de Dunn.

A média observada do comprimento da cauda do cometa da concentração de

1,73g.L⁻¹ (3,98±0,46) demonstrou diferença quando comparada com a média do controle negativo (0,69±0,13). A concentração de 1,73g.L⁻¹ apresentou genotoxicidade para o parâmetro comprimento da cauda do cometa.

As médias das demais concentrações do decocto de *C. regium* oscilaram conforme resultados do Teste de Dunn, entre a concentração de 1,73g.L⁻¹ e o controle negativo, podendo apresentar genotoxicidade.

Foi observado que as concentrações do decocto de *C. regium* apresentaram forte correlação positiva ($p=0,0001$ e $r_s=1$) e regressão linear positiva ($p=0,0445$ e $R^2=0,7105$) entre concentração e resposta para o parâmetro comprimento da cauda do cometa conforme gráfico 8.

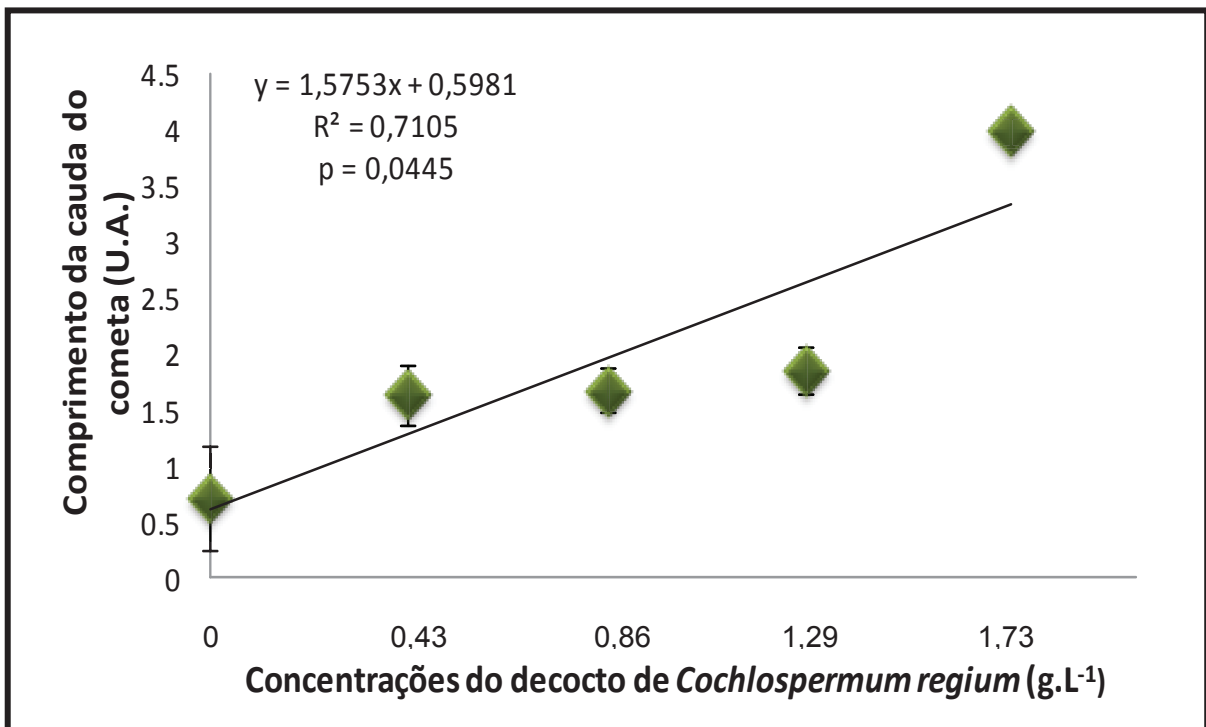


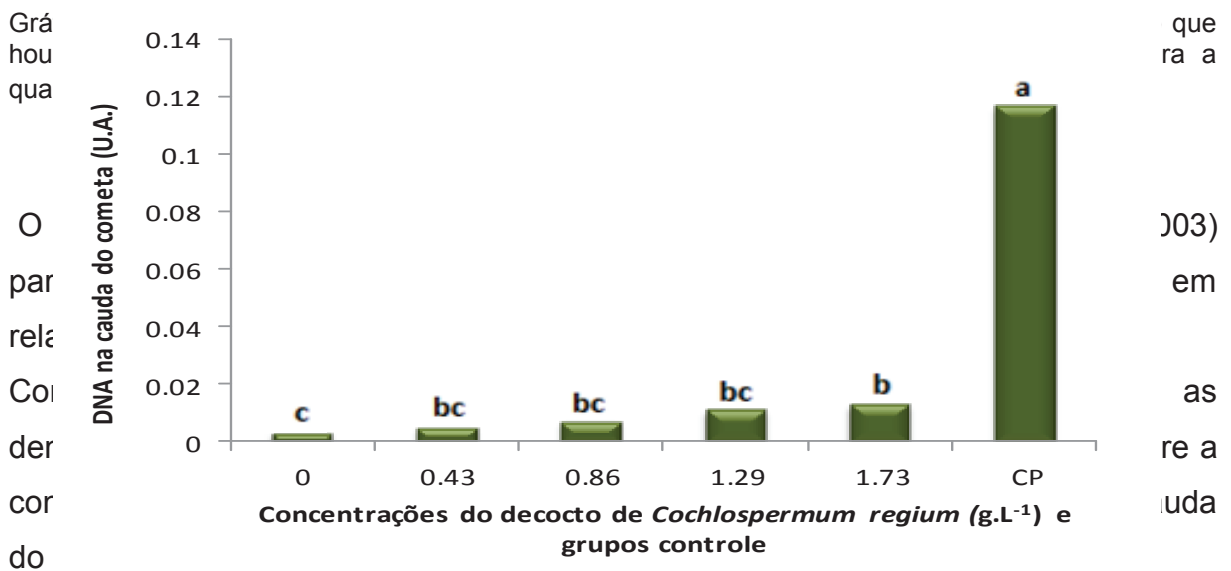
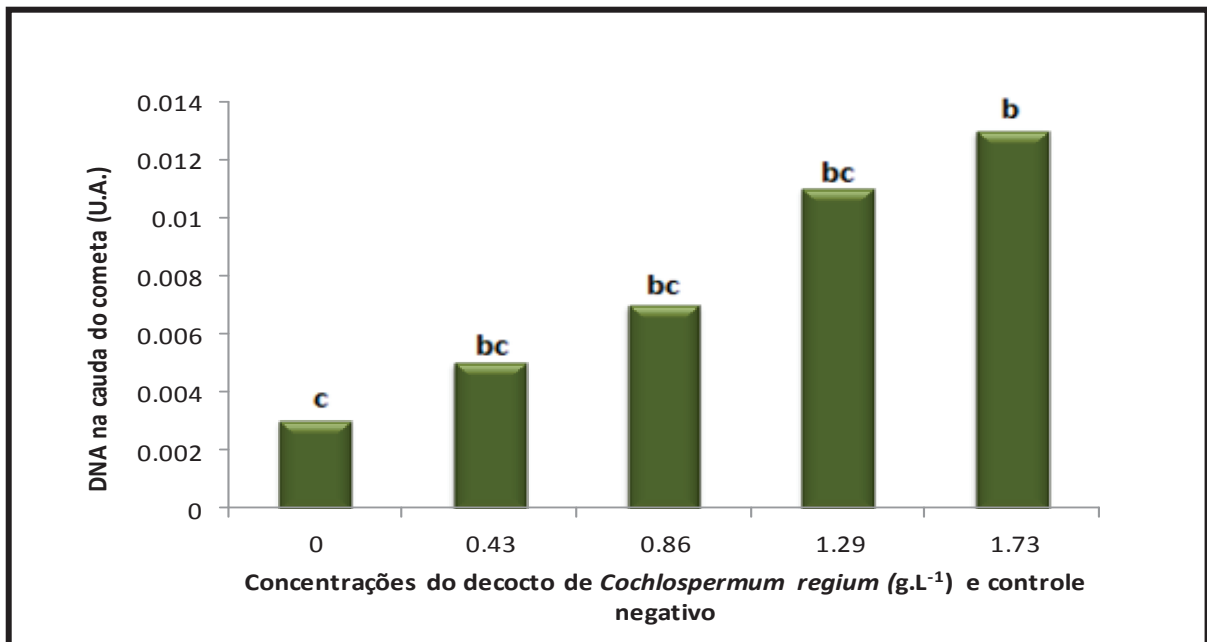
Gráfico 8 – Análise de regressão linear simples entre as concentrações do decocto de *Cochlospermum regium* e as médias obtidas para o parâmetro comprimento da cauda do cometa em nucleóides de linfócitos T humanos.

Na avaliação da quantidade de DNA na cauda do cometa, também foi observado diferenças ($p=0,0037$) entre as médias dos tratamentos quando comparadas com os grupos controle, conforme indicado na Tabela 10 e Gráfico 9.

Tabela 10 – Relação entre as concentrações utilizadas em linfócitos T humanos, demonstrando que houve diferença conforme resultado do Teste de Dunn entre as médias apresentadas para o parâmetro quantidade de DNA na cauda do cometa.

| Concentração g.L ⁻¹ | Quantidade de DNA na Cauda do Cometa (U.A.) | Total de células analisadas |
|--------------------------------|---|-----------------------------|
| | $\bar{x} \pm S$ | |
| 1,73 | 0,013 ± 0,003 ^b | 100 |
| 1,29 | 0,011 ± 0,003 ^{bc} | 100 |
| 0,86 | 0,007 ± 0,001 ^{bc} | 100 |
| 0,43 | 0,005 ± 0,001 ^{bc} | 100 |
| 0 | 0,003 ± 0,0008 ^c | 100 |
| CP | 0,117 ± 0,021 ^a | 100 |

(U.A.) Unidade Arbitraria. ^a, ^b e ^c resultados do teste Kruskal-Wallis seguido pelo Teste de Dunn ($p < 0,05$). \bar{x} símbolo da média e S símbolo do desvio padrão.



Foi observado que as concentrações do decocto de *C. regium* apresentaram forte correlação positiva ($p=0,0001$ e $rs=1$) e regressão linear positiva ($p=0,0008$ e $R^2=0,9767$) entre concentração e resposta conforme gráfico 10.

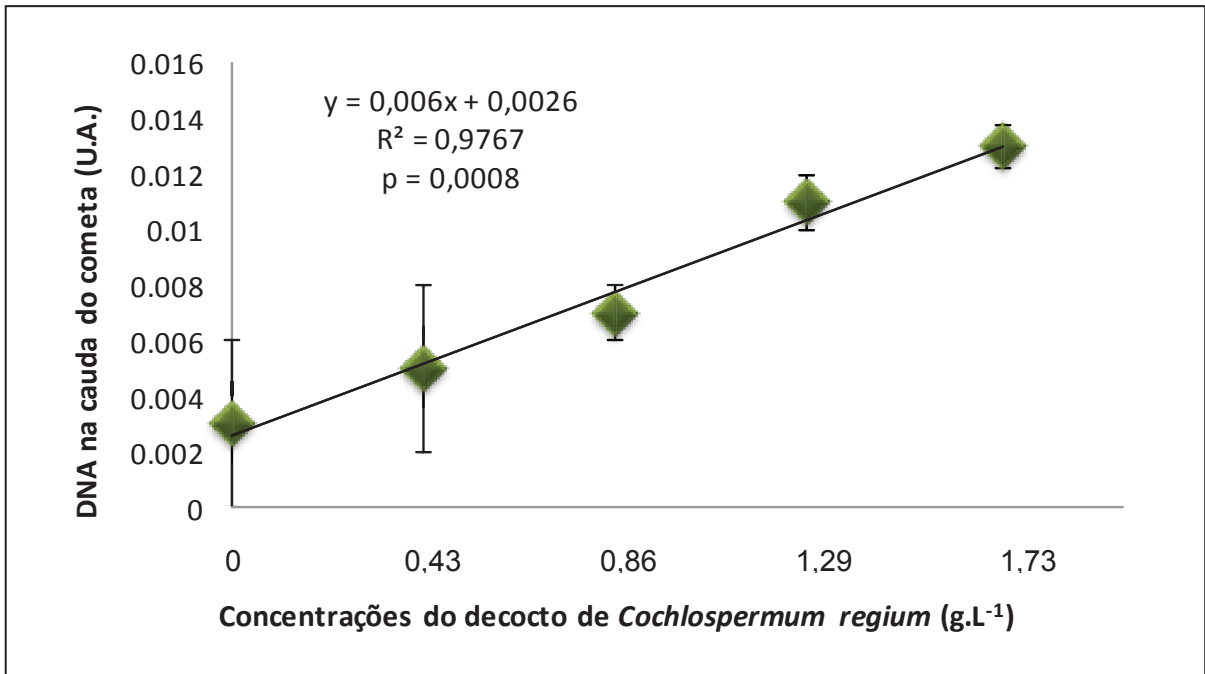


Gráfico 10 – Análise de regressão linear simples entre as concentrações do decocto de *Cochlospermum regium* e as médias obtidas para o parâmetro quantidade de DNA na cauda do cometa em nucleóides de linfócitos T humanos.

Conforme os resultados obtidos pelo ensaio cometa (comprimento da cauda e quantidade de DNA na cauda do cometa) em linfócitos T humanos por período de exposição de três horas a concentração de 1,73g.L⁻¹ do decocto de *C. regium* demonstrou atividade genotóxica.

6 DISCUSSÃO

6.1 Utilização da CL₅₀ em *Poecilia reticulata*

Com o objetivo de contribuir para a compreensão dos limites toleráveis para a saúde humana e ambiental de diversos agentes químicos, vários pesquisadores têm utilizado espécimes de *Poecilia reticulata* em experimentos *in situ* e/ou *ex situ*¹ como bioindicadores em testes de toxicidade aguda ou CL₅₀ para conhecer as condições de uso seguro dessas substâncias.

A CL_{50/96h} estimada para *P. reticulata* de 0,25g.L⁻¹ ou 250mg.L⁻¹ do decocto de *Cochlospermum regium*, pode ser considerada ligeiramente tóxica conforme classificação descrita por Zucker para organismos aquáticos (Manrique, 2009), pois usando a mesma classificação, considerou a CL_{50/96h} definida para *P. reticulata* do agrotóxico Fipronil[®] de 0,08mg.L⁻¹ e 0,09mg.L⁻¹ como extremamente tóxico.

Utilizando o extrato hidroalcoólico de *C.regium*, Toledo (1996) e Toledo *et al.* (2000), em experimento agudo e sub-agudo observaram moderada toxicidade em camundongos e ratos com administração intraperitoneal, o que não foi constatado quando a via de administração foi oral, pois em ratos provocou baixa toxicidade, esses resultados corroboram com a classificação de ligeira toxicidade observada na CL₅₀ estimada em 0,25g.L⁻¹ do decocto dessa espécie em indivíduos de *P. reticulata*.

Favero *et al.* (2005), em seus estudos de toxicidade aguda dos agrotóxicos paration metílico (FOLIDOL 600[®]) e glifosato (Glifosato Nortox[®]) foram considerados tóxicos para *P. reticulata*. O mesmo ocorreu com oxicloreto de cobre, um fungicida amplamente utilizado em varias culturas, pois apresentou acumulo de cobre no organismo dessa espécie (Boock; Machado Neto, 2005). Parma de Croux, Toleste e Campana (2002) definiram a CL_{50/96h} em 46,4µg.L⁻¹ de Piretróide cipermetrina, um conhecido inseticida, para *P. reticulata*. Carnnavan (2009), definiu CL_{50/24h} para dicromato de potássio em 50mg.L⁻¹ para esta espécie.

¹ Termo citado por Chen and White (2004) ao revisar vários métodos de avaliação de mutagenicidade em sedimentos aquáticos. Em 2009 por Anderson *et al.* em estudos com solo contaminado com o teste do cometa, e em 2011 por Oliveira Alves *et al.* com o teste do micronúcleo em *Tradescantia pallida*.

Conforme observado, devido as suas diversas interações ecológicas e características a espécie *P. reticulata* é utilizada para os mais diversos estudos comprovando eficácia e segurança em sua utilização.

Contudo, Ribo (1997) e Cruz *et al.* (2006) ressaltaram sobre a dificuldade de correlacionar resultados de toxicidade entre organismos de diferentes espécies, pois a sensibilidade desses organismos expostos à teste, pode variar devido ao lote de animais, idade, alimentação e aclimatação, ainda mais extrapolar esses resultados obtidos em organismos no laboratório para os seres humanos, portanto, os testes de toxicidade não permitem obter uma resposta absoluta sobre o dano que uma determinada substância representa para a saúde humana.

6.2 Teste do Micronúcleo

De acordo com resultados obtidos para o teste do micronúcleo em eritrócitos de *P. reticulata* utilizando o decocto de *C. regium*, a concentração de $0,25\text{g.L}^{-1}$ apresentou diferença ($p=0,0046$) com o controle negativo, indicando que nesta concentração o decocto demonstrou ação mutagênica. Conforme observações de Ribeiro (2003) essa diferença aqui constatada, pode ser caracterizada pela manifestação de distúrbios nos processos de divisão e desenvolvimento celular nas células analisadas.

Porém, não foi possível distinguir se os micronúcleos observados neste estudo foram originados pela ação de agentes clastogênicos - que quebram cromossomos, e ou aneugênicos - que induzem aneuploidia ou segregação cromossômica anormal.

As análises de correlação ($p=0,023$ e $r=0,9279$) e regressão linear simples ($p=0,0212$ e $R^2=0,8146$) observadas demonstram que o decocto de *C. regium* apresenta concentração-dependente, pois quanto maior a concentração administrada maior o dano observado. Isso indica que é possível calcular a quantidade de micronúcleos conforme o aumento da concentração, ou seja, de acordo com a fórmula ($y = 11,9x + 2,2$) a cada aumento de 1g.L^{-1} na concentração de *C. regium* há um aumento de cerca de 14,1 micronúcleos em eritrócitos de *P. reticulata*.

O decocto na concentração de $0,25\text{g.L}^{-1}$ também apresentou diferença ($p=0,0007$) quando comparada com o controle negativo na avaliação das alterações eritrocíticas nucleares (AENs) encontradas com núcleos reniformes e lobados, portanto evidenciando ação citotóxica. Inclusive a diferença entre esses tratamentos mostrou que a maior concentração de *C. regium* avaliada apresentou o dobro de danos observados quando comparado com os danos do controle negativo.

Também foi constatado por meio das análises de correlação ($p=0,0178$ e $r=0,9392$) e regressão linear simples ($p=0,0161$ e $R^2=0,8424$) observadas que o decocto de *C. regium* apresenta concentração-dependente, pois quanto maior a concentração administrada maior o dano observado. Isso também indica que é possível calcular a quantidade de alterações eritrocíticas nucleares de acordo com a fórmula ($y = 13,1x + 2,2$) onde a cada aumento de 1g.L^{-1} na concentração de *C. regium* há um aumento de cerca de 15,3 AENs em eritrócitos de *P. reticulata*.

Conforme o aumento das concentrações de *C. regium* pôde se observar um constante aumento na média de micronúcleos e alterações morfológicas nucleares em eritrócitos de *P. reticulata*, portanto esse aumento pode ser causado pelas substâncias químicas presentes nos metabólitos secundários dessa espécie, pois Souza-Filho (2011) constatou que vários estudos genotóxicos e mutagênicos indicam que essas alterações ocorram devido aos eventos mutagênicos, citotóxicos e genotóxicos causados por substâncias químicas, apesar do pouco conhecimento sobre o processo de formação dessas alterações descritas em peixes.

A mutagenicidade observada neste estudo pode ter sido induzida pelos compostos químicos constituintes de *C. regium*, das quais alguns já foram identificados como carcinogênicos e mutagênicos, incluindo os flavonóides, taninos e os terpenóides (Castro *et al.*, 2004). Santos (2006) constatou em seu estudo, que, de acordo com as caracterizações químicas realizadas com dez espécies medicinais do cerrado brasileiro utilizadas em especial para o tratamento de úlceras, ficou evidente a participação efetiva dos compostos fenólicos (flavonóides e taninos também encontrados em *C. regium*) na indução de mutação. Nesse contexto, Sólton (2009) reforça a necessidade de se associar estudos biológicos, químicos e tecnológicos na busca de extratos secos enriquecido com substâncias ativas e com menos ter de compostos indesejáveis.

Contudo, a concentração de $0,06\text{g.L}^{-1}$ do decocto, conforme condições experimentais realizadas não apresentou mutagenicidade e citotoxicidade no sistema *in vivo*, pois as médias observadas nesta concentração estiveram abaixo do controle negativo.

As médias de micronúcleos e alterações eritrocíticas nucleares das concentrações de $0,19\text{g.L}^{-1}$ e $0,13\text{g.L}^{-1}$ do decocto de *C. regium* conforme resultados do teste de Tukey oscilaram, entre um efeito mutagênico e citotóxico, pois se aproximavam dos resultados obtidos na concentração de $0,25\text{g.L}^{-1}$, tanto quanto se aproximavam dos resultados obtidos pelo controle negativo. Portanto, estas concentrações podem causar efeito mutagênico e citotóxico.

Corroborando com resultados obtidos pelo teste do micronúcleo deste estudo que indica que *C. regium* apresenta dose-dependente, Santos (2002) e Andrade *et al.* (2008), também observaram efeito mutagênico e citotóxico do extrato liofilizado da espécie pelo teste do micronúcleo em medula óssea de camundongos *Mus Musculus* a partir da concentração de 38mg.Kg^{-1} até 114mg.Kg^{-1} , esta última apresentando média de 13,6 micronúcleos contra média de 2 encontrados para o controle negativo para cada 1000 células avaliadas, enquanto que em eritrócitos de *P. reticulata* a concentração de $0,25\text{g.L}^{-1}$ apresentou média respectivamente de 5,5 e 5,6 para micronúcleos e AENs para cada 3000 células avaliadas contra média de 2,8 e 2,7 para os controles negativos, indicando que quanto maior a concentração do extrato, maior a média de micronúcleos induzida. Esses resultados demonstram que apesar de ambos os resultados serem mutagênicos e dependentes da concentração, a média de danos observados em *P. reticulata* foi inferior aos encontrados em camundongos, essa diferença pode ter sido causada pela via de administração e concentração do extrato de *C. regium*. Contudo essa diferença entre as médias encontradas se deva ao fato de Willians e Metcalfe (1995) observarem que a frequência de micronúcleos é cerca de 3% menor em peixes do que em roedores, e que em todos os ensaios com micronúcleos deve-se levar em consideração sua ocorrência espontânea. Porém, a mutagenicidade de *C. regium* também foi detectada por Castro *et al.* (2004), pelo decréscimo da relação de eritrócitos policromáticos e eritrócitos normocromáticos (EPC/ENC), e pelo aumento na frequência de micronúcleos.

Apesar de Toledo (1996) e Toledo *et al.* (2000) constatarem em experimento agudo e sub-agudo que o extrato hidroalcoólico de *C. regium* provocou baixa

citotoxicidade quando administrado via oral e moderada toxicidade quando administrada via intraperitoneal em ratos e camundongos, Ceschini e Campos (2006) relatam que em soluções muito concentradas o extrato aquoso de *C. regium* apresenta ação citotóxica, pois em seu estudo com células ovarianas de hamster chinês (CHO–K1), foi observado uma diminuição significativa da proliferação celular na concentração de $1,5\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, induzindo a apoptose em 50% das células viáveis. Outro estudo que comprova a atividade citotóxica observada em eritrócitos de *P. reticulata* do decocto de *C. regium* foram apresentados por Souza *et al.* (2011) utilizando o bioensaio *Allium cepa*, que também apresentou ação citotóxica, constatando que o decocto na concentração de $50\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ possivelmente interrompa o ciclo celular em prófase, porém, devido a falta de células em metáfase e anáfase para a avaliação a mutagenicidade, não foi possível avaliar seu efeito mutagênico nas concentrações de $1\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, $12,5\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, $25\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, $37,5\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ e $50\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ avaliadas em seu bioensaio. Apesar destes estudos mostrarem elevada citotoxicidade da espécie, diminuindo e até mesmo interrompendo o ciclo celular, em eritrócitos de *P. reticulata* essa citotoxicidade na concentração de $0,25\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ do decocto foi observada devido ao aumento da média de alterações morfológicas nucleares em relação média do controle negativo.

Apesar de diversos estudos comprovarem a atividade mutagênica de *C. regium*, resultados também obtidos no presente estudo, demonstraram que o decocto nas concentrações avaliadas de $1,73\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, $1,29\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, $0,86\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ e $0,43\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, não induziram danos mutagênicos em cultura de linfócitos humanos binucleados do sangue periférico expostos por período de 48 horas para o teste do micronúcleo. Foram em concordância com este resultado Nunes e Carvalho (2003), que ao avaliarem a mutagenicidade pelo teste RXL em machos de *D. melanogaster* (capaz de detectar a perda total do anel cromossoma X, a presença de mosaicismos, perda parcial do cromossomo Y e não-disjunção), nas concentrações $13\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, $19\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ e $25\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ avaliadas, o extrato de *C. regium* também não exibiu atividade clastogênica e mutagênica.

Todavia, as análises de correlação ($p=0,006$ e $r=0,9707$) e regressão linear simples ($p=0,005$ e $R^2=0,923$) apontam que apesar de nenhuma das concentrações de *C. regium* avaliadas em linfócitos humanos apresentarem mutagenicidade, elas demonstram que os danos induzidos pelo decocto dessa espécie é concentração-dependente, e que provavelmente em concentrações maiores o decocto poderia

exibir mutagenicidade, pois conforme $(y = 0,4051x + 0,3008)$ pode haver o aumento de 0,71 micronúcleo para cada 1g.L^{-1} de aumento na concentração.

Porém outros ensaios que também demonstram que *C. regium* não apresenta atividade mutagênica, foram realizados por Carvalho (2002) e Carvalho, Fiúza e Chen (2004) que encubaram por 48 horas as cepas de *Salmonella typhimurium* TA97a, TA98, TA100 e TA102 em diferentes concentrações do extrato liofilizado das raízes diluídas em água, não observaram ação mutagênica, pois o extrato não provocou aumento considerável no número de células revertentes dentro dos padrões estabelecidos. Inclusive destaca que possivelmente o decocto tenha apresentado ação antimutagênica, atuando como desmutagênico, modulando a atenuação da ação mutagênica pelo teste de Ames. Com o intuito de avaliar um possível efeito antimutagênico Andrade *et al.* (2008), administrou o extrato aquoso de *C. regium* nas concentrações de 114mg.Kg^{-1} , 76mg.Kg^{-1} , 38mg.Kg^{-1} e 29mg.Kg^{-1} simultaneamente a Ciclofosfamida e Mitomicina C em camundongos (Swiss) e realizou o teste do micronúcleo em eritrócitos do sangue periférico, observando que não houve redução na frequência de micronúcleo em eritrócitos policromáticos, portanto não exibindo efeito antimutagênico.

Foi observado que houve divergência entre os resultados do teste de micronúcleo em eritrócitos de *P. reticulata* que na concentração de $0,25\text{g.L}^{-1}$ do decocto foi mutagênico e citotóxico e em linfócitos humanos em nenhuma das concentrações avaliadas apresentou este efeito, provavelmente devido às diferenças dos sistemas avaliados, pois os peixes segundo (Al-Sabti, 1991) são excelentes bioindicadores para estudos mutagênicos, pois podem metabolizar, concentrar e armazenar substâncias. Entretanto, o resultado do teste do micronúcleo observado em sistema *in vitro* com linfócitos humanos pode ter sido influenciado pela não metabolização do decocto em meio de cultura, pois Takahashi (2003) relata que em testes de aberrações cromossômicas *in vitro*, as células em cultura nem sempre conseguem realizar uma metabolização adequada dos compostos químicos. Apesar do teste do micronúcleo *in vitro* em linfócitos humanos ser um sistema de avaliação de mutagenicidade usado com o objetivo de identificar substâncias capazes de induzir danos no DNA e avaliar o risco de exposição aos xenobiontes, e que a análise de células binucleadas permite uma contagem precisa e correta dos danos ocorridos, pois elas representam células que sofreram uma divisão celular após a exposição aos agentes mutagênicos, a média averiguada nas concentrações do

decocto de *C. regium* não apresentaram diferença entre a média espontânea ocorrida no controle negativo (Muller; Streffer, 1991; Pacheco; Hackel, 2002).

Corroborando com a diferença observada neste estudo entre os diferentes sistemas testes avaliados STURBELLE *et al.* (2010), também constatou divergência entre o teste do micronúcleo em linfócitos humanos binucleados que não demonstrou efeito mutagênico de *Aloe vera* em diversas concentrações, sugerindo inclusive um efeito antimutagênico quando utilizada juntamente com o paracetamol, entretanto apresentou ação mutagênica e citotóxica em sistema teste vegetal com *Allium cepa* na concentração de 400ml.L⁻¹.

Contudo, Silva (2008) avaliou o extrato aquoso de *Solanum lycocarpum* e o extrato etanólico de *Nectandra membranaceae* pelo teste do micronúcleo *in vitro* modificado (acrescentou na cultura a fração humana S9 que “ativa o metabolismo”) e não constatou atividade mutagênica significativa com ou sem a presença dessa fração e que linfócitos humanos e células do baço de camundongo expostas a compostos mutagênicos, indicam alta sensibilidade de ambas as células para a formação de micronúcleos. Porém é importante ressaltar que esses agentes podem interagir diretamente com a molécula de DNA ou tornar-se mutagênicos ao sofrer reações metabólicas e que a contagem dos micronúcleos pode ser subestimada devido a não observação de perda do material cromossômico por meio de processos como a reincorporação (RAMIREZ; SALDANHA, 2002; VARELLA *et al.*, 2004; STEIBLEN *et al.*, 2005). Apesar da presença dos componentes como flavonóides e taninos no extrato de *C. regium* serem identificados como carcinogênicos e mutagênicos, nas condições estabelecidas neste estudo, o extrato não induziu aumento de danos cromossômicos em linfócitos humanos.

Não obstante a essas desvantagens, os linfócitos humanos têm sido utilizados como sistemas testes na avaliação de danos genéticos devido a diversas vantagens, como o fato de se tratar de células humanas, pois o peso da evidencia é maior, serem de fácil obtenção e não necessitarem de manutenção (SUZUKI, 2003; CHEQUER, 2008). Além de evitarem o sacrifício de muitos animais também utilizados em ensaios mutagênicos.

Neste contexto, Marsiglia *et al.*, (2011) salientaram que esses resultados servem de alerta para a necessidade de estudos adequados sobre a toxicidade e genotoxicidade, antes da utilização desenfreada de plantas ou de qualquer outro produto natural e sugerem que os efeitos tóxicos e citotóxicos dessas espécies,

possam ser explicados pela ação dos metabólitos secundários dessas plantas sobre os sistemas avaliados. Portanto, os compostos químicos alcalóides, flavonóides e taninos presentes em *C. regium* provavelmente sejam os responsáveis pela atividades mutagênica e até mesmo não mutagênicas observadas em *P. reticulata* e linfócitos humanos deste estudo.

6.3 Ensaio Cometa

Segundo os procedimentos realizados não foi possível detectar efeitos genotóxicos, utilizando a versão alcalina do ensaio cometa que parece ser pelo menos duas vezes mais sensível na capacidade de detectar danos do que as outras versões do teste como relatam Rojas, Lopes e Valverde (1999), pois este estudo indicou que nas concentrações avaliadas o decocto de *C. regium* não apresentou ação genotóxica sobre eritrócitos de *P. reticulata* pelo período de 96 horas de exposição. Nesse sentido, provavelmente o teste cometa não detectou danos genotóxicos nas concentrações do decocto de *C. regium* em eritrócitos de *P. reticulata* devido ao tempo prolongado de exposição.

Essa ressalva se justifica, pois em média 24 horas após a exposição ao mutágeno, neste caso as concentrações do decocto de *C. regium*, os danos podem ter sido corrigidos, pois o reparo começa imediatamente, apesar de alguns relatos ressaltarem que os mecanismos de reparo do DNA de peixes serem mais lentos do que em células de mamíferos. Desta forma como o ensaio cometa não detecta mutações, e sim lesões genômicas que podem resultar em mutações, pois essas lesões podem ser corrigidas, o resultado observado neste estudo demonstra que o sistema de reparo em eritrócitos de *P. reticulata* pode ter sido eficiente quando submetidos às concentrações do decocto de *C. regium* aqui avaliados. Também é importante ressaltar que este ensaio apesar de ser um teste simples e rápido, e poder ser executado em qualquer eucarioto, ele também possui suas limitações (ESPINA; WEISS, 1995; ALBERTINI *et al.*, 2000; SILVA *et al.*, 2003).

As análises de correlação ($p=0,9347$) e regressão linear simples ($p=0,8593$) indicam que para os parâmetros avaliados pelo ensaio cometa em *P. reticulata*, o decocto de *C. regium* não apresentou concentração-dependente.

Entretanto, o decocto de *C. regium* apresentou ação genotóxica em exposição de 3 horas para realização do ensaio cometa em linfócitos humanos, quando comparado com os grupos controle. As médias observadas nos parâmetros comprimento da cauda e quantidade de DNA na cauda do cometa avaliados, demonstraram que a concentração de $1,73\text{g.L}^{-1}$ do decocto apresentou diferenças ($p=0,0001$ e $p=0,0037$) em relação às médias dos controles negativo, inferindo sua atividade genotóxica.

As demais concentrações do decocto $1,29\text{g.L}^{-1}$, $0,86\text{g.L}^{-1}$ e $0,43\text{g.L}^{-1}$ oscilaram conforme resultados do teste de Dunn e podem apresentar genotoxicidade

Em linfócitos humanos, as análises de correlação ($p=0,0001$ e $r=1$) e regressão linear simples ($p=0,0445$ e $R^2=0,7105$) para o parâmetro comprimento na cauda do cometa e correlação ($p=0,0001$ e $r=1$) e regressão ($p=0,0008$ e $R^2=0,9767$) para o parâmetro quantidade de DNA na cauda do cometa, salientam que o decocto de *C. regium* apresenta concentração-dependente, e conforme as fórmulas ($y=1,5753x+0,5981$ e $y=0,006x+0,0026$) a cada aumento de 1g.L^{-1} na concentração, aumente concomitantemente 2,2 (U.A.) Unidade Arbitrária e 0,0086 (U.A.) Unidade Arbitrária respectivamente para os parâmetros avaliados.

Apesar de nenhuma das concentrações avaliadas do decocto de *C. regium* em eritrócitos de *P. reticulata* apresentarem efeito genotóxico, este estudo também demonstrou que em concentrações superiores como a de $1,73\text{g.L}^{-1}$ avaliada em culturas de linfócitos humanos o decocto dessa espécie apresentou ação genotóxica, para ambos os ensaios foi utilizada a versão alcalina do ensaio cometa. Essa divergência de resultados provavelmente se deva as diferenças individuais dos sistemas *in vivo* e *in vitro* testadas. Fagundes *et al.* (2005) ressaltam que mesmo que alguns extratos vegetais contenham metabólitos secundários genotóxicos, não se conhece profundamente os mecanismos envolvidos que explicam a clastogenicidade e/ou interação desses compostos com o DNA.

Quanto à atividade genotóxica de *C. regium* observada no sistema *in vitro*, Gontijo e Tice (2003) relatam que linfócitos humanos isolados não possuem suprimento suficiente de nucleotídeos para completar processos de reparo e podem apresentar acúmulo de sítios incompletos de reparo. Contudo, como o ensaio cometa detecta lesões passíveis de reparo, talvez os danos aqui detectados possam ser reparados ou não.

Estudos que foram em concordância com os aqui apresentados foram realizados por Nunes (2000) onde o teste SMART/olho em células somáticas de *Drosophila melanogaster* apresentou atividade genotóxica do extrato aquoso liofilizado de *C. regium* nas concentrações de $0,025\text{g.mL}^{-1}$, $0,019\text{g.mL}^{-1}$ e $0,013\text{g.mL}^{-1}$ em tratamento por 24 horas, o que não foi constatado pelo teste Ring-X-loss utilizando as mesmas concentrações em células germinativas.

É importante ressaltar que o confronto dos resultados aqui avaliados, é muito difícil, pois ambos nem podem ser relacionados, pois as variáveis observadas são muitas, tais como, divergências entre a forma de preparo da espécie *C. regium* avaliadas, diferenças entre as concentrações estudadas, os ensaios experimentais utilizados, períodos de exposição e até mesmo diferenças entre os organismos-teste avaliados. Além da diferença de sensibilidade dos ensaios utilizados, pois Bucker, Carvalho e Alves-Gomes (2006), observam que em seus experimentos o teste do cometa se mostrou mais sensível que o teste do micronúcleo para detectar danos. Apesar da detecção de danos mutagênicos e genotóxicos apresentados, até o presente a forma e os mecanismos de ação de determinadas substâncias sobre o DNA e RNA são desconhecidos (SOUZA-FILHO, 2011).

Atualmente tem se intensificado a freqüência de estudos para desmistificar o conceito de que o produto natural derivado das plantas medicinais, não possui efeitos adversos à saúde humana, portanto, poderiam ser usados indiscriminadamente pela população. Para avaliar o potencial de agressão ao DNA pelos produtos fitoterápicos em geral são utilizados diferentes organismos-teste para determinação da mutagenicidade. É evidente que não se pode assegurar que os mesmos efeitos produzidos em uma espécie sejam proporcionais para outra. No entanto, os resultados de diferentes estudos indicam que efeitos adversos podem ocorrer e têm sido observados em todos os sistemas usados.

Face ao exposto acima, o decocto de *C. regium* apresentou atividade mutagênica, citotóxica e genotóxica nos ensaios experimentais avaliados, inclusive apresentando concentração-dependente, contra-indicando sua utilização.

7 CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES

A $CL_{50/96h}$ estimada para *Poecilia reticulata* do decocto de *Cochlospermum regium* foi de $0,25g.L^{-1}$.

A concentração de $0,25g.L^{-1}$ do decocto de *C. regium* demonstrou atividade mutagênica em eritrócitos de *P. reticulata* pelo teste do micronúcleo.

O decocto de *C. regium* na concentração de $0,25g.L^{-1}$ também apresentou ação citotóxica em relação às alterações eritrocíticas nucleares observadas em *P. reticulata* pelo do teste do micronúcleo.

O ensaio cometa não identificou potencial genotóxico do decocto de *C. regium* em *P. reticulata* nas concentrações avaliadas.

Os resultados deste estudo permitiram inferir que o decocto de *Cochlospermum regium* nas concentrações de $1,73g.L^{-1}$; $1,29g.L^{-1}$; $0,86g.L^{-1}$ e $0,43g.L^{-1}$ avaliadas em linfócitos humanos binucleados não apresentou atividade mutagênica.

O ensaio cometa indica que a concentração de $1,73g.L^{-1}$ apresentou atividade genotóxica para os parâmetros avaliados em linfócitos humanos. E as demais concentrações testadas do decocto de *C. regium* apresentaram baixo potencial genotóxico quando comparadas com os grupos controle.

Em quase todos os ensaios realizados *in vivo* e *in vitro* houve forte correlação positiva e regressão linear simples positiva entre concentração e resposta, indicando que o decocto desta espécie apresenta relação concentração-dependente.

Na tentativa de aprofundar o conhecimento sobre plantas medicinais em especial *C. regium*, são necessários novos estudos que elucidem melhor as atividades mutagênica, citotóxica e genotóxica demonstradas neste estudo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; POBER, J.S. **Imunologia celular e molecular**. Rio de Janeiro: Revinter, 1995.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº48**. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol>. Acessado em 25jul.2009.

AGNEZ-LIMA, L.F., DE MEDEIROS, S.R.B, MARQUES, R.C.P., PINHEIRO, M.M, MENCK, C.F.M. Processos de reparo de DNA: garantindo a estabilidade do genoma In: **Mutagênese Ambiental**. Canoas: ULBRA, 2003.

AHNSTROM, G. Techniques to measure DNA single-strand breaks in cells: a review. **Int. J. Radiat. Biol.** 54, 695-7-7, 1988.

ALBERTINI, R. J. *et al.* IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogen in human. **Mutation Research – Reviews in Mutation Research**, v.463. Amsterdam, p. 111-172, 2000.

ALBERTS, B.; BRAY, D.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M. **Fundamentos da Biologia Celular: Uma introdução à biologia molecular da célula**. Edição Universitária 2º reimpressão, Porto Alegre (RS), Artmed, 2002.

ALLEN, G.R. **Fied guide to the freshwater fishes of New Guinea. Christensen Reseach Intitute, Madang, Papua New Guinea**. 1991. disponível em : filaman.ifmgeomar.de/References/ReferencesList.Cfm Acessado em 03ago.2010.

ALMEIDA, K.C., BARBOSA, T.R., da SILVA, R.N.R. JACQUES, D.S., FREIRE,R.B. Efeito citotóxico do infuso aquoso de *Psidium guajava* L. (Myrtaceae). **Rev. Bras. Farm.**, 87, 2, p60-62. 2006.

ALMEIDA NETO, X. J. *et al.*, Avaliação do efeito mutagênico da Palma forrageira (*Opuntia ficus-indica* Mill) através do teste do micronúcleo em medula óssea de ratos (*Rattus novergicus*, Linhagem Wistar) *in vivo*. **Revista de biologia e Ciências da Terra**, 5, 2, p1-11, 2005.

AL-SABTI, K. Micronuclei induced by selenium, mercury, methylmercury and their mixtures in binucleated blocked fish erythrocyte cells. **Mutat. Res.** v. 320, p157-163, 1991.

AL-SABTI, K.; METCALFE, C. D. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. **Mutation Research – Genetic Toxicology.** v.343, p121-135, 1995.

AMES, B.N. Dietary carcinogens and anticarcinogens: oxygen radicals and degenerative diseases. **Science.** v.221, n.4617, p1256-64, 1983.

ANDERSON, D., PLEWA, M.J. The international Comet Assay. **Workshop Mutagenesis.** 13, p67-73, 1998.

ANDRADE, H.H.R., LEHMANN, M. Teste para detecção de mutação e recombinação somática (SMART) em *Drosophila melanogaster*. In: **Mutagênese Ambiental.** Canoas: ULBRA, 2003.

ANDRADE, L. S.; SANTOS, D. B.; CASTRO, D. B.; GUILLO, L. A.; CHEN-CHEN, L. Absence of antimutagenicity of *Cochlospermum regium* (Mart. and Schr.) Pilger 1924 by micronucleus test in mice. **Brazilian Journal Biology.** v. 68, n. 1, p155-159, 2008.

ANEEL/IBGE. **Agencia Nacional de Energia Elétrica e Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística.** 2000. Disponível em <http://www.povosdocerrado.org.br/wp-content/uploads/mapa-cerrado-base-com-rodovias.jpg&imgrefurl=> Acessado em 01out.2009.

ANTUNES, M.N. **Constituintes químicos de *Cochlospermum regium* (Martius e Schrank) Pilger (Bixaceae).** 2009. 89f. Dissertação (Mestrado). Universidade Católica de Goiás, Universidade Estadual de Goiás e Centro Universitário de Anápolis. Goiânia, Goiás. 2009.

AQUINO, I. **Efeito genotóxico da artemisina e do artesunato em células de mamíferos.** 2010. 81f. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Botucatu, São Paulo. 2010.

ARORA, S.; BRITS, E.; KAUR, K.; SOHI, R.S.; KUMAR, S.; VERSCHEVE, L. Evaluation or genotoxicity of medicinal plant extracts by the comet and Vitotox (R) tests. **J Environ Pathol Toxicol Oncol.**, 24, p193-200, 2005.

AUTOCOMET.com 2010. Disponível em:
http://www.autocomet.com/products_cometscore.php . Acessado em 01out.2011.

BERNARDI, D. **Mutação e reparo.** 2011. 3p. Disponível em
<http://www.sobiologia.com.br/conteudos/Biotecnologia/.html>. Acessado em
06mar.2011.

BOOK, M.V., MACHADO NETO, J.G. Estudos sobre a toxicidade aguda do Oxicloreto de cobre para o peixe *Poecilia reticulata*. **B. Inst. Pesca.** V.31, n.1, São Paulo, p29-35, 2005.

BORLAUG, N.E. Feeding a world of 10 billion people: the miracle ahead. In: R. Bailey (ed.). Global warming and other eco-myths, **Competitive Enterprise Institute.** Roseville, EUA. p. 29-60, 2002.

BORGES-OSÓRIO, M.R.; ROBINSON, W.M. **Genética humana.** 2 ed. Porto Alegre. Artemed. 2001.

BRIGANTE, J.; ESPÍNDOLA, E. L. G. **Limnologia fluvial: um estudo no rio Mogi-Guaçu.** São Carlos, Rima, 2003.

BRISKIN, D. Medicinal Plant and Phytomedicines. Linking Plant Biochemistry and Physiology to Human Health. **Plant Physiology**, 124, p507-514, 2000.

BUCKER, A., CARVALHO, W., ALVES-GOMES, J.A. Avaliação da mutagênese e genotoxicidade em *Eigenmannia virescens* (Teleostei: Gymnotiformes) expostos ao benzeno. **Acta Amazônica.** v.36, n.3, p357-364, 2006.

BURNS, G.W., BOTTINO, P.J., **Genética.** 6ª Ed. Rio de Janeiro (RJ), Editora Guanabara Koogan, 1991.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.33, p179 – 189, 2000.

CAMILLO, J. **Germinação e conservação de germoplasma de Algodão-do-Campo [Cochlospermum regium (Mart. ex Schrank) Pilger] – Cochlospermaceae.** 2008. 113f. Dissertação (Mestrado). Universidade de Brasília. Brasília, DF. 2008.

CAMILLO, J. J. E.; SCHERWINSKI-PEREIRA, R. F. VIEIRA; PEIXOTO, J. R.. Conservação "in vitro" de *Cochlospermum regium* (Schrank) Pilg. – Cochlospermaceae sob regime de crescimento mínimo. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.11, n.2, p184-189, 2009.

CANNAVAM, M.C. Determinação da sensibilidade de *Poecilia reticulata* para o dicromato de potássio através de testes de toxicidade. **Revista eletrônica de Biologia**. v.2, n.4, p13-25, 2009.

CANIGUERAL, S. VILA, R. **Fitoterapia: vademecum de prescripción**. Barcelona: Masson; 2000.

CAPELA, F.S. **Avaliação de Biomarcadores**. Departamento de Biologia, Universidade de Évora. 2001.

CAPASSO, R.; IZZO, A. A.; PINTO, L.; BIFULCO, T.; VITOBELLO, C.; MASCOLO, M.; **Fitoterapia**, v.58, p.71, 2000.

CARDOSO, P.C.S., CABRAL, I.R., SANTOS, R.A., LEAL, M.F., CALGAGNO, D.Q., BAHIA, M.O., MOREIRA, C.F.A., BASTOS, G.N.T., NASCIMENTO, J.L.M., BURBANO, R.M.R., TAKAHASHI, C.S. Investigação da genotoxicidade do extrato aquoso de *Physalis angulata* (camapu) em linfócitos humanos. Resumos do 50º Congresso Brasileiro de Genética. Sociedade Brasileira de Genética. 2004. **Resumo, 1087**.

CARRASCO, K. R.; TILBURY, K. L.; MYERS, M.S. Assessment of the piscine micronucleus test as an in situ biological indicator of chemical contaminant effects. **Can. J. Fish. Sci.**, v.47, Ottawa, p2123-2136, 1990.

CARVALHO, L. L. L. S. **Detecção da atividade mutagênica e anti-mutagênica do *Cochlospermum regium* (algodãozinho do campo) pelo teste ames**. 2002. 79f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Goiás, 2002.

CARVALHO, L. L. L. S., FIUZA, R.A., CHEN, C.L. Detecção da atividade mutagênica e anti-mutagênica do *Cochlospermum regium* (algodãozinho do campo) pelo teste ames. Resumo do 50º Congresso Brasileiro de Genética. 2004. **Resumo, 1107**.

CASTRO, M. S. A., DE SIQUEIRA, J. M., PAZ-VIEIRA, I. C., KASSAB, N. M. Estudos sobre o efeito analgésico e anti-edematogênico de uma flavanona isolada de *Cochlospermum regium*, "algodãozinho". In: XIII Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil. Fortaleza: UFC. 1994. **Resumo, 162**.

CASTRO, D. B., D. B. SANTOS, H. D. FERREIRA, S. C. SANTOS; CHEN-CHEN, L. Atividades Mutagênica e Citotóxica do Extrato de *Cochlospermum regium* Mart. (algodãozinho-do-campo) em camundongos. Rev. (algodãozinho-do-campo) em camundongos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.66, n.3, p15-19, 2004.

CESCHINI, L. CAMPOS, E.G. Cytotoxic effects of *Cochlospermum regium* (Mart and Schrank) Pilger aqueous root extract on mammalian cells. **J. Ethnopharmacol.**, v.103, n.2, p302-305, 2006.

CETESB. **Métodos de avaliação da toxicidade de poluentes a organismos aquáticos**. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental, São Paulo, 1: 149p. 1999.

CHEQUER, F.M.D. **Utilização do teste de micronúcleo na avaliação da toxicidade dos azo corantes Disperse Red 1, Disperse Orange 1 e Disperse Red 13**. . 2008. 124f. Dissertação (Mestrado). Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, São Paulo. 2008.

COOK, P. R., BRAZELL, I.A. Conformations constraints in nuclear DNA. **J. Cell. Sci.**, v.22. p287-302, 1976.

COOK, P. R., BRAZELL, I.A. Spectrofluorometric measurement of the biding of ethidium to superhelical DNA from cell nuclei. **Eur. J. Biochem.** v.84, p465-477, 1978.

CORREA, R. A. S.O.S. Cerrado: Help! Help! **Revista de Pedagogia**. v.1, n.1, 2000.

COSTA, R.M.A; MENK, C.F.M. Biomonitoramento de mutagênese ambiental. **Biotecnologia: Ciência & Desenvolvimento**. v.2, n.12, p24-26, 2000.

COUTINHO, L. M. **O bioma cerrado**. In: Klein, A. L. (org). Eugen Warming e o Cerrado Brasileiro: um século depois. Ed. Unesp. São Paulo, SP. 2002.

CRUZ,C.;GOMES,G.R.;VENTURINI,F.P.;HERNARES,M.N.P.;SHIOGIRI,N.S.W.;PITELL I,R.A. **Sensibilidade de três peixes neotropicais ao dicromato de potássio utilizado como substância de referência em testes de toxicidade**. IX Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia - São Pedro, S.P. 2006.

CUCHIARA, C.C., BORGES, C.S., SOPESKI, M.S., SOUZA, S.A.M., BOBROWSKI, V.L. Efeito Antiproliferativo dos Extratos Aquosos de Mamona

(*Ricinus communis* L.). **Revista Brasileira de Biociências**, v.5, n.2, Porto Alegre, p639-641, 2007.

da CRUZ, A. D.; McARTHUR, A.G.; SILVA, C. C.; CURADO, M. P.; GLICKMAM, B. W. Human micronucleus counts are correlated with age, smoking, and cesium-137 dose in the Goiânia (Brasil) radiological accident. **Mutation Research Environmental**. nº. 313, p.57-68, 1994.

da SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J.A.P. **Genética Toxicológica**. Porto Alegre: Alcance, v.1, p424, 2003.

da SILVA, J.; HERMANN, S.M.; HEUSER, V.; PERES, W.; POSSA MARRONI, N.; GONZALEZ-GALLEGO, J.; ERDTMANN, B. Evaluation of the genotoxic effect of rutin and quercetin by comet assay and micronucleu test. **Food and Chemical Toxicology**. n.40, p941-947, 2002.

de ROBERTIS, E. M. F.; HIB, J. e PONZIO, R. **Replicação do DNA**, In: Biologia celular e molecular. Editora Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, RJ, 2003.

DEVENTER, K. Detection of genotoxic effects on cells of liver and gills of *B. rerio* by means of single cell gel electrophoresis. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.** v.56, p911-918, 1996.

DIAS, E.M. **Mecanismos de reparo**. 2011. 1-6p. Disponível em <http://www.escola.pt/topico.asp?id=339.htm>. Acessado em 15fev.2011.

DINIZ, M.F.F., OLIVEIRA, R.A.G., MALTA JUNIOR, A. Implantação da disciplina de fitoterapia nos cursos da área da saúde: o exemplo da Universidade Federal da Paraíba. **Infarma**. p911-918, 2001.

EITEN, G. **Delimitação do conceito de Cerrado**. Arquivos do Jardim Botânico, 21, 125-134, 1977.

ELGORASHI, E.E., TAYLOR J.L.S, MAES A, VAN STADEN, J. De KIMPE, N., VERSCHAEVE, L. Screening of medicinal plants used in South African traditional medicine for genotoxic effects. **Toxicol Lett**. v.143, p195-207, 2003.

ERIKSSON, S., NYGREN, J., AHNSTROM, G. Matrix association of early-and late-replicating chromatin studied by single-cell-electrophoresis. *Biochim. Biophys. Acta*, p103-108, 2002.

ESPINA, N. G.; WEISS, P. DNA repair in fish from polluted estuaries. **Marine Environmental Research**, v.3, Kidlington, p309-12, 1995.

FAIRBAIRN, D.W., OLIVE, P.L., O'NEILL, K.L. The comet assay: a comprehensive review. **Mutat. Res.** v.339, p37-59, 1995.

FAGUNDES, F.A., OLIVEIRA, L.B., CUNHA, L.C., VALADARES, M.C. *Annona coriacea* induz efeito genotóxico em camundongos. **Rev Eletron Farmácia**. v.2, p24-29, 2005.

FAVERO, S., MARMO DE SOUZA, E., MATIAS, R. Ecotoxicidade do Paration metílico e Glifosato para *Poecilia reticulata* (Pisces - Poeciliidae) em laboratório. **Ensaios e Ciências**, v.9, n.2, p315-324, 2005.

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research**. n.455, p81-95, 2000.

FERES, F., A. P. SOUZA, M. C. E. AMARAL e V. BITTRICH. Avaliação de métodos de preservação de amostras de plantas de savanas neotropicais para a obtenção de DNA de alta qualidade para estudos moleculares. **Revista Brasileira de Botânica**, v.28, n.2, p277-283, 2005.

FERRARI, I. Teste do micronúcleo em cultura temporária de linfócitos. In: Rabello-Gay, M. N.; Rodrigues, M. A. R.; Monteleone-Neto, R. Mutagênese Teratogênese e Carcinogênese: métodos e critérios de avaliação. **Revista Brasileira de Genética**. Ribeirão Preto, p107-122, 1991.

FERRARO, M. V. M. et al . Mutagenic effects of tributyltin and inorganic lead (Pb II) on the fish *H. malabaricus* as evaluated using the comet assay and the piscine micronucleus and chromosome aberration tests. **Genetic and Molecular Biology**, v.27,n.1, p103-107, 2004.

FERRARO, M.V.M. **Avaliação de Três Espécies de Peixes- Rhamdia quelen, Cyprinus carpio e Astyanax bimaculatus, como Potenciais Bioindicadores em Sistemas Hídricos Através dos Ensaio: Cometa e dos Micronúcleos**. 2009. Tese (Doutorado). Universidade Federal Paraná. Curitiba-PR. 2009.

FILHO, C. V.; R. A. YUNES. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais: conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v.21, n.1, p99-105, 1998.

FONSECA, G. A. B., L. P. S. PINTO; A. B. RYLANDS. Biodiversidade e Unidades de Conservação. **Conservation International do Brasil**. 1-20. 1997.

FONCECA, C.A., PEREIRA, D.G. Aplicação genética toxicológica em planta com atividade medicinal. **Infarma** v.16, n.7-8, p1-4, 2004.

FOGLIO, M. A., C. L. QUEIROGA, I. M. de O. SOUZA; R. A. F. RODRIGUES. Plantas medicinais como fonte de recursos terapêuticos: um estudo multidisciplinar. **MultiCiência**. P1-8, 2006.

FREITAS, P.S. **Investigação do potencial mutagênico do extrato de frutos de *Vaccinium corybosum* (mirtilo) em células do sangue periférico de camundongos Swiss *in vivo***. . 2007. 92f. Dissertação (Mestrado). Universidade Jose do Rosário Vellano – UNIFENAS. Alfenas, Minas Gerais. 2007.

GARTNER, L.P., HIATT, J.L. **Tratado de histologia: em cores**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S. A., 1999.

GHERARDI-GOLDSTEIN, E.; BERTOLETTI, E. e ZAGATTO, P. A. **Procedimentos para a utilização de testes de toxicidade no controle de efluentes líquidos**. São Paulo: CETEB, 17p. 1990.

GEBHARDT, R. In vitro screening of plant extracts and phytopharmaceuticals: novel approaches for the elucidation of active compounds and their mechanisms. **Planta Medica, Stuttgart**, v.66, n.2, p99-105, 2000.

GOBBO-NETO, L.; N.P. LOPES. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v.30, n.2, p374-381, 2007.

GONÇALVES, L.M.; CONCEIÇÃO, M.B.; RESGALL-JUNIOR, C. Avaliação do potencial genotóxico das águas do Rio Itajaí-Açú ezona costeira sobre os hemócitos do mexilhão *Perna perna* através do Ensaio do Cometa. In: II SIMPÓSIO BRASILEIRO DE ENGENHARIA AMBIENTAL, Itajaí, SC. Livro de **Resumos**. Vol.1. Itajaí: UNIVALI, p 384, 2003.

GONÇALVES, A. **Concentração letal CL50-96h e efeitos sub-letais do selenito de sódio (Na₂SeO₃) em tilapia do Nilo, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1757). Alterações hematológicas e histopatológicas**. 2004. 71f. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual Paulista, Centro de Aquicultura da UNESP, Campus de Jaboticabal. Jaboticabal, São Paulo. 2004.

GONTIJO, A.M.M.C., TICE, R. Teste do cometa para detecção de dano no DNA e reparo em células individualizadas In: **Mutagênese Ambiental**. Canoas: ULBRA, 2003.

GOODLAND, R. J. A.; M. G. FERRI. **Ecologia do Cerrado**. 1ª Edição, Editora USP, São Paulo, SP. 1979.

GOTTIEB, O. R., M. R. M. B. BORIN, C. L. A. C. PAGOTTO & D. H. T. ZOCHER. Biodiversidade: o enfoque interdisciplinar brasileiro. **Ciência e saúde coletiva**, v.3, n.2, p97-102, 1998.

GRIFFITHS, A. J. F.; GELBART, W. M.; MILLER, J. H.; LEWONTIN, R. C. Mutações genicas, p. 177-208. In: **Genética moderna**. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, RJ, 2001.

GUARIM NETO, G. **Plantas utilizadas na medicina popular do Estado de Mato Grosso**. Ministério da Ciência e Tecnologia/ CNPQ. Brasília, DF. 58p. 1987.

GUARIM NETO, G.; R. G. MORAIS. Recursos medicinais de espécies do cerrado de Mato Grosso: um estudo Bibliográfico. **Acta Botânica Brasileira**, v.17, n.4, p561-584, 2003.

GUSMÃO, C.L.S., SILVA, C.L., TAKAHASHI, C.S. Avaliação do efeito genotóxico e mutagênico do extrato de nim (*Azadirachta indica* A. Juss.) sobre linfócitos humanos. Resumos do 50º Congresso Brasileiro de Genética. Sociedade Brasileira de Genetica. 2004. **Resumo 1083**.

HARTMANN, A.; AGURELL, E.; BEEVERS, C.; BRENDLER-SCHWAAB, S.; BURLINSON, B.; CLAY, P.; COLLINS, A.; SMITH, A.; SPEIT, G.; THYBAUD, V.; TICE, R.R. Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. **Mutagenesis**. v.18, n.1, p45-51, 2003.

HAMILTON, M. A.; RUSSO, R.C.; THURSTON, V. Trimmed Spearman – Karber method for estimating medial lethal concentrations in toxicity bioassays. **Environ. Sci. Techno.**, v.7, p714 – 719, 1977.

HANUSCH, A.L.; MACHADO, R.C.; da SILVA, C.C.; da CRUZ, A.D. Caracterização da atividade genotoxicológica do extrativo de *Croton urucurana*: Bioensaio *in vitro*. 56º Congresso Brasileiro de Genetica. **Resumo. 2010**.

HANUSCH, A.L.; MACHADO, R.C.; PORTIS, I.G.; de ABREU, J.B.; da SILVA, C.C.; da CRUZ, A.D. Teste de micronúcleos em eritrócitos de *Poecilia reticulata* (Poeciliidae) na avaliação do potencial mutagênico do extrativo de *Croton urucurana* (Euphorbiaceae). 56º Congresso Brasileiro de Genética. **Resumo. 2010.**

HEDDLE, J. A. A rapid *in vivo* test for chromosomal damage. **Mutation Research.** v.18, p187–190, 1973.

HEDDLE, J. A. et al. The Induction of Micronuclei as a Measure of Genotoxicity. **Mutation Research – Genetic Toxicology.** v. 123, p61–118, 1983.

HELFRICH, L.A.; WEIGMANN, D.L.; HIPKINS, P.; STINSON, E.R. **Pesticides and aquatic animals: a guide to reducing impacts on aquatic systems**, Virginia, 1996. 24p. Disponível em: <http://www.ext.vt.edu/pubs/water_quality/420-013/420-013.pdf>. Acesso em: 21jan.2011.

HERRICKS, E. **Princípios gerais de toxicologia.** In: MATSUI, S.; BARRETT, B. F. D.; BANERJEE, J. Gerenciamento de substâncias tóxicas em lagos e reservatórios. (Série Diretrizes para o gerenciamento de lagos). São Carlos: ILECIIE. v.4, p.9 – 30, 2002.

HOUK, V. S. The genotoxicity of industrial wastes and effluents: A review. **Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology.** v.277, n.2, p291-138. August 1992.

IARMARCOVAI, G., BONASSI, S., BOTTA, A., BAAN, R.A., ORSIERE, T. Genetic polymorphisms and micronucleus formation: a review of the literature, **Mutat Res**, v.658, n.3, p215-233, 2008.

IBAMA. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Brasil, Ministério do Meio Ambiente. **Avaliação da toxicidade aguda para peixes.** In: Manual de testes para avaliação da ecotoxicidade de agentes químicos. Brasília, p. 20-32. 1987.

IBAMA. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. **Lista oficial de Espécies Brasileiras Ameaçadas de Extinção.** Instrução Normativa MMA, 2008. nº 6, de 23 de setembro de 2008. Disponível em http://www.ibama.gov.br/recursos-florestais/wp-content/files/IN-MMA_06-2008.pdf. Acessado em 10Set.2009.

ICMBio. Instituto Chico Mendes. MMA. Ministério do Meio Ambiente. **Cerrado.** Disponível em <http://www.icmbio.gov.br/portal/biodiversidade/unidades-de>

-conservacao/biomas-brasileiros/cerrado. Acessado em 09dez.2011.

IBAMA. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. **Informativo especial do Ministério do Meio Ambiente**. 1 (6) p1-2, 2009.

INACIO, M.C. **Estudo agronomico, quimico e biologico de *Cochlospermum regium* (Mart. Ex. Schrank): uma espécie medicinal do cerrado**. 2010. 118f. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Campus de Botucatu. Botucatu, São Paulo. 2010.

KLAUDE, M. et al. The comet assay: mechanisms and technical considerations. **Mutation Research – DNA Repair**, Amsterdam, v. 363, p89-96, 1996.

KIRIZAWA, M. **Contribuição ao conhecimento morfo-ecológico e do desenvolvimento anatômico dos órgãos vegetativos e de reprodução de *Cochlospermum regium* (MART. e SCHR.) PILGER – Cochlospermaceae**. 1981. 437 f. Tese (Doutorado) - IB/USP, São Paulo. 1981.

KISS, I.; KOVÁTS, N.; SZALAY, T. Evaluation of some alternative guideline for risk assessment of various habitats. **Toxicology Letters**, v.140-141, 2003.

KLINK, C. A.; MACHADO, R. B. Conservação do cerrado brasileiro. **Megadiversidade**, v.1, n.1, p1-9, 2005.

KUMARAVEL, T. S. et al. Comet Assay measurements: a perspective. **Cell Biology and Toxicology**. 2007.

LAPA, A.J., SOUCCAR, C., LIMA-LANDMAN, M.T.R., GODINHO, R.O., NOGUEIRA, T.C.M.L. Farmacologia e toxicologia de produtos naturais. In Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA and Petrovick PR (org). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5.ed. Porto Alegre: Ed. Universidade/UFRGS, 2004.

LIMA *et al.* Metabólitos secundários de *Cochlospermum regium*. **Fitoterapia**, v.66, p.545-46, 1995.

LIMA, P.L.A., RIBEIRO, L.R. Teste de mutação gênica em células de mamífero (mouse lymphoma assay) In: **Mutagênese Ambiental**. Editora da ULBRA. Canoas-RS. 2003.

LOHMANN, T.H.O. **Análise de radiosensibilidade de linfócitos periféricos de pacientes com câncer de pele e de indivíduos sadios por meio do método do micronúcleo.** 1995. 92f. Dissertação de Mestrado. Instituto de Pesquisas energéticas e nucleares, Autarquia Associada a Universidade de São Paulo. São Paulo. 1995.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas.** Nova Odessa, SP, Instituto Plantarum, 2002.

MACHADO, R. B., M. B. RAMOS NETO, P. G. P. PEREIRA, E. CALDAS, D. A. GONÇALVES, N. S. SANTOS, K. TABOR, M. STEININGER.. **Estimativas de perda da área do Cerrado brasileiro.** Conservação Internacional – Programa do Brasil, Brasília, DF. 2004.

MANRIQUE, W.G. **Toxicidade aguda e risco ecotoxicológico do finopropil para o guaru (*Poecilia reticulata*) e dissipação no ambiente aquático.** Dissertação de Mestrado. 2009. 58f. Universidade Estadual Paulista. Jaboticabal, São Paulo. 2009.

MANSO, J.A.X.; HANUSCH, A.L.; MACHADO, R.C.; MATTOS, C.A.A.; CUNHA, D.M.C.; da SILVA, C.C.; da CRUZ, A.D. Use of alkaline comet assay for analysis of human T-lymphocytes exposed to tisanes infusion of *Momordica charantia* (Cucurbitaceae). 56º Congresso Brasileiro de Genética. **Resumo. 2010.**

MARASCHIN, M. & R. VERPOORTER. Engenharia do metabolismo secundário. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v.2, n.9, p.1-9, 1999.

MARONI, M.; COLOSIO, C.; FERIOLI, A & FAIT, A. Biological Monitoring of Pesticide Exposure: a review, Introduction. **Toxicology**, v. 143, p.1-118, 2000.

MARSIGLIA, J.D.C., LOSS, A.C.C., STANGE, V.S., BELCAVELLO, L., LUZ, A.C., BATITUCCI, M.C.P. Avaliação dos efeitos tóxico, citotóxico e genotóxico do extrato bruto hidroalcoólico de *Solanum cordifolium* Dunal e *Solanum torvum* Sw. **Natureza on line**, v.9, n.1, p.30-34, 2011.

MARTINS, E.R; CASTRO, D.M; CASTELLANI, D.C; DIAS, J.E. **Plantas Mediciniais.** Universidade Federal de Viçosa, 2003.

MAVOURNIN K.H., BLAKEY D.H.; CIMINO M.C.; SALAMONE M.F.; HEDLE J.A. The in vivo Micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the U.S. Environmental Protection Agency. Gene-Tox Program. **Mutation Res.** v.239, p.29-80, 1990.

MAZZA, M. C. M.; J. V. M. BITTENCOUT. Extração de DNA de tecido vegetal de *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae). **Bol. Pesq. FI**, v.41, p.12-17, 2000.

MENDONÇA, R. C., J. M. FELFILI, B. M. T. WALTER, M. C. SILVA Jr, A. V. REZENDE, T. S. FILGUEIRAS, P. E. NOGUEIRA. Flora vascular do Cerrado, p.288-556. In S. Sano & S. Almeida (eds.). **Cerrado. Ambiente e flora**. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa - Cerrados, Planaltina. Brasília, DF 1998.

MENDONÇA, R. C., J. M. FELFILI, B. M. T. WALTER, M. C. SILVA Jr, A. V. REZENDE, T. S. FILGUEIRAS, P. E. NOGUEIRA, C. W. FAGG. Flora vascular do Bioma Cerrado: checklist com 12.356 espécies, p.421-442. In Sano, S. M., S. P. Almeida & J. F. Ribeiro. **Cerrado: ecologia e flora**. Planaltina-DF: Embrapa Cerrados, 2008.

MILLER, A. C; GAFNER, J.; CLARK, E. P. AND SAMID, D. Differences in radiation-induced micronuclei yields of human cells: influence of ras-gene expression protein localization. **Int. J. Radiat. Biol.** v.64, p.547-54, 1993.

MING, L. C., S. M. P. SILVA, M. A. S. SILVA, A. F. HIDALGO, J. A. MARCHESE;, F. C. M. CHAVES. Manejo e cultivo de plantas medicinais: algumas reflexões sobre perspectivas e necessidades no Brasil, In: **Diversos olhares em etnobiologia, etnoecologia e plantas medicinais**. Unicen. Cuiabá, MT. 2003.

MISSOURI BOTANICAL GARDEN, Saint Louis. **Cochlospermum regium (Schrank) Pilg. - Taxonomy Browser**. Disponível em: <<http://www.tropicos.org/Name/8000024>>. Acesso em: 02dez.2009.

MITCHELMORE, C. L.; CHIPMAN, J. K. DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring. **Mutation Research – Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, Amsterdam, v. 399, p. 135-147, 1998.

MONTEITH, D. K.; VANSTONE, J. Comparison of the Microgel Electrophoresis Assay and other Assays for Genotoxicity in the Detection of DNA Damage. **Mutation Research – Genetic Toxicology**. v. 345, p. 97-103, 1995.

MOREIRA, L.M.A., ARAUJO, L.M.P., CORDEIRO, A.P.B., GUSMAO, F.A.F. Teste de linfócitos humanos no reconhecimento do efeito clastogenico e citotóxico da 5-fluoracil. **R. Ci. Med. biol.** v.3, n.1, p.5-12, 2004.

MOTTIN, E., MANFREDINI, V., SCHWANZ, M. **Detecção de dano de DNA leucocitário causado por extrato aquoso de *Maytenus ilicifolia* Mart. Ex Reiss.** 2011. 1-15p.

MULLER, W. U. STREFFER, R. C. Biological indicators for radiation damage. **Int. J. Radiat. Biol.** v. 59, p.863-73, 1991.

MYERS, N. R. A., C. G. MITTERMEIER, G. A. MITTERMEIER, B. FONSECA, J. KENT. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v.403, p.853-858, 2000.

NACCI, D.E., CAYULA, S., JACKIM, E. Detection of DNA damage in individual cells from marine organisms using the single cell gel assay. **Aquatic Toxicology**. v.35. p.197-210, 1996.

NETO, M.S. **Avaliação das atividades analgésica, antiinflamatória e antipirética do extrato hidroalcoólico bruto de *Cochlospermum regium* (Mart & Schrank) Pilger em ratos.** Dissertação de Mestrado. 2009. Universidade Católica de Goiás, a Universidade Estadual de Goiás e o Centro Universitário de Anápolis. Goiânia-GO. 2009.

NUNES, W. B. **Avaliação do potencial mutagênico e/ou recombinogênico do algodãozinho do campo em células somáticas e germinativas de *D. melanogaster*.** 2000. 112f. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Goiás. Goiânia. 2000.

NUNES, A.P.M.; ARAUJO, A.C.; Ausência de genotoxicidade do esteviosídeo em *E. coli*. In. X Semana de Iniciação Científica da UERJ, Rio de Janeiro, 2003. **Anais**. p.15.

NUNES, G. P., M. F. SILVA, U. M. RESENDE, J. M. SIQUEIRA. Plantas medicinais comercializadas por raizeiros no centro de Campo Grande, Mato Grosso do Sul. **Revista Brasileira de Farmacologia**, v.13, n.2, p.83-92, 2003.

NUNES, W. B.; CARVALHO, S. Evaluation of the mutagenic potential of *Cochlospermum regium* in *Drosophila melanogaster* male germ cells. **Genet. Mol. Biol.**, v.26, n. 4, p.545-549, 2003.

OGA, S. **Fundamentos de toxicologia**. 5 ed. São Paulo. Atheneu. 1996.

OLIVE, P.L., BANATH, J.P. Radiation-induced DNA double-strand breaks produced in histone-depleted tumor cell nuclei measured using the neutral comet assay. **Radiat. Res.** v.142, p.144-152, 1995.

OLIVEIRA, C. C., J. M. SIQUEIRA, K. C. B. SOUZA, U. M. RESENDE. Avaliação da atividade antibacteriana da raiz de *Cochlospermum regium* “algodãozinho”, In: Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, 13, Fortaleza, CE. 1994. **Anais**, p.155.

PACHECO, A. O., HACKEL, C. Instabilidade cromossômica induzida por agroquímicos em trabalhadores rurais da região de Passo Fundo. **Cadernos de Saúde Pública.** v.18, p.1675-1683, 2002.

PARMA DE CROUX, M.J., LOTESTE, A., CAMPANA, M. Toxicidad aguda del piretroide cipermetrina em *Poecilia reticulata* e *Cnesterodon decemmaculatus* (Pisces, Poeciliidae). **Revista FABICID**, v.6, p.69-74, 2002.

PEREIRA, A. M. S., D. B. SILVA, R. B. N. ALVES, R. F. VIEIRA. Recursos genéticos de plantas medicinais do cerrado, p.37-73. In Pereira, A. M. S. (org) **Recursos genéticos e conservação de plantas medicinais do cerrado**. Fapesp. Ribeirão Preto, SP. 2007.

PEREIRA, A. M. S., J. F. RIBEIRO. O Cerrado: reserva genética ameaçada, p. 13-36. In Pereira, A. M. S. (org) **Recursos genéticos e conservação de plantas medicinais do cerrado**. Fapesp. Ribeirão Preto, SP. 2007.

PERON, A.P., FELIPES, L., MATTGE, G.I., CANTAGALLI, L.B., MARIUCCI, R.G., VICENTINI, V.E.P. Avaliação mutagênica das plantas medicinais *Baccharis trimera* Less. e *Solanum melongena* L. em células de medula óssea de ratos Wistar. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 6, n. 2, p.127-130, 2008.

PETERS, W. **Untiled Monatsberiche der Könglichen Preassischen Akademic der Wissenschaften zu Berlin**, p.127-130 1860; 1859.

PINA, C.D.S. **Avaliação da exposição profissional ao Formaldeído: efeito genotóxico**. Dissertação de Mestrado. 2010. 77f. Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto. 2010.

PINTO, L.F.R., FELZENSSWALB, I. Genética do câncer humano In: **Mutagênese Ambiental**. Canoas: ULBRA, 2003.

PIO CORREA, M. L.. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional (Ministério da Agricultura, Ind. e Comércio). v.1, p.747, 1975.

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

RAMIREZ, A., SALDANHA, P.H. Micronucleus investigation of alcoholic patients with oral carcinomas. **Genet. Mo.I Res.** v.1, n.3, p. 246-260, 2002.

RAND, G.M. PETROCELLI, S.R. **Fundamentals of aquatic toxicology** Washigton, Publinshing. Hemisphere, 1985. 665p.

RAZIN, .S.V., GROMOVOA, I.I., IAROVAIA, O.V. **Specificity and fuctional singnificance of DNA interaction with the nuclear matrix: new approaches to clarify the old questions**. 1995. 405-404.

REBOUÇAS, S.O., Da SILVA, J., BERTONI, R., DECKER, N., SANTOS, M.S., ROSSATTO, R.R., FERRAZ, A.B.F. Evaluation of the genotóxico and antigenotoxic effects from the *Himatanthus aticulatus* aqueous and ethanolic extracts. X Congresso Brasileiro da SBMCTA. Sub-área: Mutagenicidade e genotoxicidade de agentes Químicos, físicos e nanomateriais. 2010. **Resumo 80**.

RIBEIRO, L.R.; SALBADORI, D.M.F.; MARQUES, E.K. **Mutagênese Ambiental**. Editora da ULBRA. Canoas-RS. 2003.

RIBEIRO, L.R.; MARQUES, E.K. A importância da mutagenese ambiental na carcinogenese humana In: **Mutagênese Ambiental**. Editora da ULBRA. Canoas-RS. 2003.

RIBEIRO, L. R. Teste de Micronúcleo em medula óssea de roedores in vivo. In: **Mutagênese Ambiental**. Canoas: ULBRA, 2003.

RIBO, J. M.; Environ. Toxicol. **Water Qual.** v.12, n.283, 1997.

RIEHL, R; BAENSCH, H.A. **Aquarien Atlas. Band. 1. Melle: Mergus, Verlag für Natur- und Heimtierkunde, Germany.** 1991. 992p. Disponível em:

<filaman.ifmgeomar.de/ReferencesList.cfm?Author=&Title=&Source=&RefNo=1672
&database=FB>Acesso em: 10mai.2008.

RITTO, J. L. A. **Caracterização farmacognóstica da droga e do extrato fluido de algodãozinho-do-campo, *Cochlospermum regium* (Mart et Schr.) Pilger.** Dissertação de Mestrado. 1996. 112f. Universidade de São Paulo, São Paulo. 1996.

ROITT, I.M., MALE, D.K., BROSTOFF, J. **Imunologia.** Manole, São Paulo. 2003. 481 p.

ROJAS, E.; LOPEZ, M. C.; VALVERDE, M. Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v. 722, p. 225-254, 1999.

SALVADORI, D.M.F., RIBEIRO, L.R., FENECH, M. Teste do micronúcleo em células humanas in vitro In: **Mutagênese Ambiental.** Canoas: ULBRA, 2003. Cap. 8 p. 201-223.

SANCHES-LAMAR, Á.; FLORES, M. Genotoxicidad de *Phyllanthus orbicularis* evaluada El ensayo de micronúcleos em células de ovario de hámster chino. **Rev Cubana Invest Biomed.** v.18, p. 22-23, 1999.

SHAW, D., C. LEON, S. KOLEV, V. MURRAY. Traditional remedies and food supplements. A 5-year toxicological study (1991-1995). **Drug Safety**, v.17, p.342-356, 1997.

SANO, E. E., R. ROSA, J. L. S. BRITO, L. G. FERREIRA. **Mapeamento de cobertura vegetal do bioma cerrado: estratégias e resultados.** Embrapa Cerrados. Planaltina, Brasília, DF. 2007. 30p.

SANTOS, M. D. dos., C. T. T. BLATT. Teor de flavonóides e fenóis totais em folhas de *Ryrostegia venusta* Miers. de mata e de cerrado. **Revista Brasileira de Botânica**, v.21, n.2, 1998.

SANTOS, D. B. **Avaliação da atividade mutagênica e anti-mutagênica do extrato de *Cochlospermum regium* Mart. (algodãozinho do campo) pelo teste de micronúcleos em camundongos.** Dissertação de Mestrado. 2002. 67f. Universidade Federal de Goiás. Goiânia-GO. 2002.

SANTOS, R.A., CABRAL, T.R., CABRAL, I.R., ANTUNES, L.M.G., ANDRADE, C.P., SANTOS, P.C.C., BAHIA, M.O., PESSOA, C., NASCIMENTO, J.L.M., BURBANO, R.R., TAKARASHI, C.S. Genotoxic effect of *Physalis angulata* L. (solanaceae) extract on human lymphocytes treated in vitro. **Biocell**, v.32, p.195-200, 2008.

SANTOS, F.V. **Avaliação da mutagenicidade *in vivo* e *in vitro* de compostos obtidos de plantas do cerrado**. Tese de Doutorado. 2006. 167f. Faculdade de Ciências Farmacêuticas UNESP. Araraquara, São Paulo. 2006.

SCHIMID, W. The micronucleus test. **Mutation research**, v.31, p.9-15, 1975.

SIEBRA, C.C.A. **Atividades biológicas de *Annona glabra* Linn., Annonaceae**. Dissertação de Mestrado. 2007. 96f. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, Paraná. 2007.

SILVA, J.; HEUSER, V.; ANDRADE, V. Biomonitoramento Ambiental. In: SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J.A.P. (org.). **Genética Toxicológica**. Porto Alegre: Alcance, 2003. p. 166-180.

SILVA, L.D.; NASCIMENTO, V.; SANTOS, S.C.; MORAIS, J.O.R.; SABÓIA-MORAIS, S.M.T. Análise morfométrica das células do cloro de *Poecilia vivipara* expostas a frações da folha e da casca do caule de *Caryocar brasiliensis*. **Acta Scientiarum**, v.25, n.1, p.195-201, 2003.

SILVA, J. **O uso do ensaio cometa para o ensino da genética toxicológica**. Genética na escola, Sociedade Brasileira de Genética. 02.02. 2007. 30-33p.

SILVA, C. S. P., C. E. B. POENÇA. Uso e disponibilidade de recursos medicinais no município de Ouro Verde de Goiás, GO, Brasil. **Acta Botânica Brasileira**, v.22, n.2, p.481- 492, 2008.

SILVA, A.A.J.S. **Teste do micronúcleo *in vitro*: validação do método através da ativação metabólica**. Dissertação de Mestrado. 2008. 75f. Universidade Federal Fluminense, Niterói, Rio de Janeiro. 2008.

SILVEIRA, P.F., BANDEIRA, M.A.M., ARRAIS, P.S.D. Farmacovigilância e reações adversas às plantas medicinais e fitoterápicos: uma realidade. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. Brazilian Journal of Pharmacognosy, v.18, n.4, p.618-626, 2008.

SINGH, N.P.; MCCOY, M.T.; TICE, R.R.; SCHNEIDER, E.L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Exp Cell Res.** n.175, p.184-191, 1988.

SIMÕES, C.M.O., et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** 2 ed. Florianópolis, Porto Alegre: Ed. Universidade/UFRGS. Ed. Da UFSC, 2000.

SIQUEIRA, J.M., CASTRO, M.S.A., MELLO, J.P.C. et al. Flavona do extrato hidroetanólico de *Cochlospermum regium* (Mart & Sch.) Pilger (Algodãozinho). In: Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil, 13 Fortaleza. Livro de Resumos 1994. **Res. 6.**

SKELTON, P.H. **A complete guide to the freshwater fishes of southern Africa.** Southern book publishers. 1993. 388p.

SÓLON, S.; BRANDÃO, L. F.G. e SIQUEIRA, J. M. O gênero *Cochlospermum* Kunth com ênfase nos aspectos etnobotânicos, farmacológicos, toxicológicos e químicos de *Cochlospermum regium* (Mart. et. Schr.) Pilger. **Revista Eletrônica de Farmácia.** v.VI, n.3, p.1 - 22, 2009.

SÓLON, S. **Análise fitoquímica e farmacognóstica da raiz de *Cochlospermum regium* (Mart. et. Schr.) Pilger, Cochlospermaceae.** Tese de Doutorado. 2009. 172f. Universidade de Brasília. Campo Grande, Mato Grosso do Sul. 2009.

SOUSA, V.C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática: Guia ilustrado para identificação de famílias fanerógamas nativas e exóticas do Brasil, baseado em APGII.** 2 ed., Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2008.

SOUZA, L.P., RIBEIRO, C.L., da CRUZ, A.D. Estudo de mutagenicidade do *Algodãozinho do Cerrado* utilizando o teste *Allium cepa*. **Revista estudos.** P.1-25, 2011.

SOUZA, L. F. Recursos vegetais usados na medicina tradicional do cerrado (comunidade de Baús, Acorizal, MT, Brasil). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais,** v.9, n.6, p.44-54, 2007.

SOUZA, A.B., SOUZA, L.M.S., CARVALHO, J.C.T., MAISTRO, E.L. No clastogenic activity of *Caesalpinia ferrea* Mart. (Leguminosae) extract on bone marrow cells of Wistar rats. **Genet Mol Biol,** v.29, p.380-383, 2006.

SOUZA, C. D., J. M. FELFILI. Uso de plantas medicinais na região de Alto Paraíso de Goiás, GO, Brasil. **Acta Botânica Brasileira**, v.20, n.1, p.135- 142, 2006.

SOUZA, S.A.M., STEIN, V.C., CATTELAN, L.V., BOBROWSKI, V.L., ROCHA, B.H.G. Utilização de sementes de alface e de rúcula como ensaios biológicos para avaliação do efeito citotóxico e alelopático de extratos aquosos de plantas medicinais. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**. v.5, n.1, p. 3-9, 2005.

SOUZA-FILHO, J. **Efeitos tóxicos e genotóxicos do herbicida Roundup Transorb® em Guppy (*Poecilia reticulata*) submetido a tratamento agudo**. Dissertação de mestrado. 2011. 146f. Universidade Federal de Goiás. 2011.

SPEIT, G.; HARTMANN, A. **The Comet Assay (Single-Cell Gel test): A sensitive Genotoxicity Test for the Detection of DNA Damage and Repair**. In: Methods in Molecular Biology, DNA Repair Protocols: Eukaryotic Systems. Human Press Inc., Totowa, N.J., USA. vol. 113, p. 203-211. 1999.

STEIBLEN, G. et al. Comparison of the relative sensitivity of human lymphocytes and mouse splenocytes to two spindle poisons. **Mutation Research. Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, Amsterdam, v. 588, p.143-151, 2005.

SUZUKI, M.F. **Avaliação dos efeitos genotóxico e citotóxico do Sm-EDTMP em linfócitos periféricos de pacientes com metástase óssea**. Dissertação de Mestrado. 2003. 99f. Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares. Autarquia Associada a Universidade de São Paulo. São Paulo. 2003.

TAKAHASHI, C.S. Testes citogenéticos in vitro e aneuploidia In: **Mutagenese Ambiental**. Canoas: ULBRA, 2003. Cap. 6 p. 151-172.

TICE R. R., AGURELL E.; ANDERSON D.; et al. The single cell gel /comet assay: Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environ. Mol. Mutagen.** v.35, p.206–221, 2000.

TOLEDO, M. I. **Avaliação da Toxicidade da espécie *Cochlospermum regium* (Mart & Schrank) Pilger**. Dissertação de Mestrado. Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. São Paulo, Brasil, 1996.

TOLEDO, M.I., SIQUEIRA, J.M., ARAUJO, L.C.L., OGA,S. Acute and subacute toxicity of *Cochlospermum regium* (Mart & Schr.) Pilger. **Phytother res.** v.14, p.359-361, 2000.

TRESVENZOL, L. M., J. R. PAULA, A. F. RICARDO, H. D. FERREIRA, D. T. ZATTA. Estudo Sobre o Comercio Informal de Plantas Mediciniais em Goiânia e Cidades Vizinhas. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v.3, n.1, p.23-28, 2006.

TUROLLA, M. S.; NASCIMENTO, E. S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, p. 289-306, 2006.

UMBUZEIRO, G.A., VARGAS, V.M.F., Teste de mutagenicidade com *Salmonella typhimutium* (Teste de Ames) como indicador de carcinogenicidade em potencial para mamíferos In: **Mutagênese Ambiental**. Canoas: ULBRA, 2003. Cap. 4 p. 81-112.

VALENTIN-SEVERIN, I., HEGARAT, L.L., LHUGUENOT, J.C., BONA, A.M.L., CHAGNONA, M.C. Use of HepG2 cell line for director of indirect mutagens screening: comparative investigation between comet and micronucleus assay. **Mutation Research**. v.533. P.79-90, 2003.

VARANDA, E.A, VARELLA, S.D, RAMPAZO, R.A., KITAGAWA, R.R., RADDI, M.S.G., VILEGAS, W, SANTOS, L. C. Mutagenic and cytotoxic effect of planifolin: a naphthopyranone dimer isolated from *Paepalanthus planifolius*. **Toxicol In Vitro**, v.20, n.5, p.664-668, 2006.

VARANDA, E.A, Atividade mutagênica de plantas medicinais. **Revista de ciências Farmaceuticas basica e aplicada**. V. 27, n.1, p.1-7, 2006.

VARELLA SD, POZETTI GL, VILEGAS W, VARANDA EA. Mutagenic activity of sweepings and pigments of a household-was factory assayed with *Salmonella typhimurium*. **Food and Chemical Toxicol.**, v.42, p.2029-2035, 2004.

VOGELSTEIN, B., PARDOLL, D.M., COFFEY, D.S., Supercoiled loops and eucaryotic DNA replication. **Cell**, v.22, p. 79-85, 1980.

WILLIAMS, R.C.; METCALFE, C.D. Development of an *in vitro* Hepatic micronucleus assay with rainbow trout. **Aquatic Toxicology**. v. 23, p. 193-202, 1992.


WHITE, P.A.; RASMUSSEN, J.B. The genotoxic hazards of domestic wastes in surface waters. **Mutation Research**. n.410, p. 223-236, 1998.

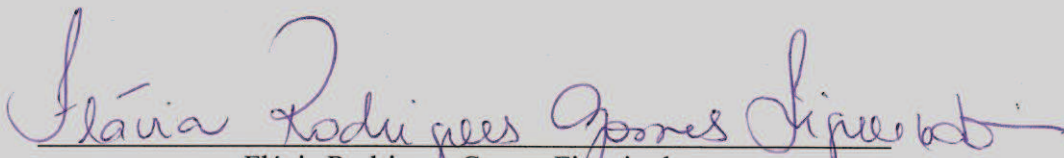
W.H.O. World Health Organization. **International Program on Chemical Safety (IPCS). Environmental Health Criteria 155.** Biomarkers and Risk Assessment: Concepts and Principles. Geneva. 1993.

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

AUTORIZAÇÃO

Eu, José Pedro Gomes, portador da identidade nº 1870933 / 2ª via SSP-GO autorizo Flávia Rodrigues Gomes Figueiredo, portadora da identidade nº 4379664 SSP-GO, mestranda do curso de Ciências Ambientais e Saúde da Pontifícia Universidade Católica de Goiás, matrícula 201010920010011, a publicação de imagem referente à coleta de espécimes de *Cochlospermum regium* realizada no Parque Municipal Serra das Areias em Aparecida de Goiânia – Goiás.


José Pedro Gomes


Flávia Rodrigues Gomes Figueiredo

Goiânia, 14 de março de 2012.



PREFEITURA MUNICIPAL DE APARECIDA DE GOIÂNIA
SECRETARIA MUNICIPAL DE MEIO AMBIENTE
Chefia de Unidades de Conservação

AUTORIZAÇÃO

A Secretaria Municipal do Meio Ambiente de Aparecida de Goiânia no uso de suas atribuições, **AUTORIZA** Flávia Rodrigues Gomes Figueiredo, inscrita no RG: 4379664 SSP-GO, Mestranda do Curso de Ciências Ambientais e Saúde da PUC – Goiás (nº de matr. 201010920010011), a realizar coleta de espécime vegetal denominada Algodãozinho do Cerrado (*Cochlospermum regium*) presente no Parque Municipal Serra das Areias com intuito de pesquisa acadêmica em sua Unidade de Ensino.

Aparecida de Goiânia, 02 de Dezembro de 2010.

THIAGO DUTRA SILVA

Chefe de Unidades de Conservação.



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

Av. Universitária, 1069 • Setor Universitário
Caixa Postal 86 • CEP 74605-010
Goiânia • Goiás • Brasil
Fone: (62) 3946.1070 • Fax: (62) 3946.1070
www.pucgoias.edu.br • prope@pucgoias.edu.br

Registro CEP ANIMAL 001/2011


DECLARAÇÃO

Declaramos para os devidos fins que o Projeto **Ensaio mutagênicos em extrato aquoso de Cochlospermum regium (Mart. ET. Schr.) Pilger: Uma espécie medicinal do cerrado**, coordenado pelo (a) pesquisador (a) **FLÁVIA RODRIGUES GOMES FIGUEIREDO** foi cadastrado no Comitê de Ética em Pesquisa da Pontifícia Universidade Católica de Goiás (CEP-SGC/PUC Goiás) sob o protocolo Reg. **ANIMAL 001/2011**, em 11/02/2011 e **aprovado** em 18/05/2011.

- CEP-SGC/PUC Goiás pode, a qualquer momento, fazer escolha aleatória de estudo em desenvolvimento para avaliação e verificação do cumprimento das normas da RESOLUÇÃO Nº 879 DO CFMV, LEI Nº 11794/08.

Categorias de pesquisa

| | |
|-----------------|-------------------------|
| TCC: | Final da pesquisa |
| Especialização: | Final da pesquisa |
| Mestrado: | Relatório anual e final |
| Doutorado: | Relatório anual e final |
| Outros: | Relatório anual e final |


Prof. Dr. José Rodrigues do Carmo Filho
Coordenador do CEP-SGC/PUC Goiás

Goiânia, 18 de maio 2011.



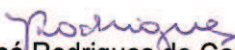
PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Goiânia, 02 de março de 2011.

Senhor Pesquisador (a)

Conforme preconiza a Resolução 196/96 e Complementares do Conselho Nacional de Saúde, todos os projetos de pesquisa envolvendo seres humanos deverão ser submetidos a um Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) para análise dos aspectos éticos previamente à sua implementação. O CEP da PUC Goiás identificou que o projeto “ENSAIOS MUTAGÊNICOS EM EXTRATO AQUOSO DE *Cochlospermum regium* (Mart. et. Schr.) Pilger: UMA ESPÉCIE MEDICINAL DO CERRADO” CAAE – 0007.0.168.000-11 não se encaixa para avaliação do Comitê de Ética em Pesquisa segundo a Resolução 196/96, motivo pelo qual foi dispensado da avaliação por esse CEP.

Atenciosamente,


Prof. Dr. José Rodrigues do Carmo Filho
Coordenador do CEP-SGC/PUC Goiás