



**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MESTRADO EM GENÉTICA**

**Avaliação do Potencial Genotóxico e Mutagênico de Extratos
Padronizados de *Caesalpinia ferrea* (jucá) e *Brosimum
gaudichaudii* (inharé)**

MARIA JOSÉ BATISTA DE SOUSA

**Avaliação do Potencial Genotóxico e Mutagênico de Extratos
Padronizados de *Caesalpinia ferrea* (jucá) e *Brosimum
gaudichaudii* (inharé)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação
Mestrado em Genética - MGene, Pontifícia Universidade
Católica de Goiás – PUC Goiás, como parte das
exigências para a obtenção do título de Mestre em
Genética.

Orientador: Dr. Cláudio Carlos da Silva

Co-Orientadora: Dr^a. Lysa Bernardes Minasi

Goiânia
© 2017

S725a Sousa, Maria José Batista de
Avaliação do Potencial Genotóxico e Mutagênico de
Extratos Padronizados de *Caesalpinia ferrea* (jucá) e *Brosimum*
gaudichaudii (inharé) [manuscrito]/ Maria José Batista de Sousa.-
- 2017.

91 f.; il.; 30 cm

Texto em português com resumo em inglês
Dissertação (mestrado) -- Pontifícia Universidade Católica de
Goiás, Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Genética,
Goiânia, 2017.

Inclui referências f.71-89

1.Genética - Pesquisa. 2. Plantas medicinais. 3. Toxicologia –
Genética. I.Silva, Cláudio Carlos da. II.Minasi, Lysa Bernardes.
III.Pontifícia Universidade Católica de Goiás. IV. Título.

CDU:575:58.085(043)



**PUC
GOIÁS**

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

ATA COMPLEMENTAR Nº 132/2017

MESTRADO EM GENÉTICA DA PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS

DISCENTE: MARIA JOSÉ BATISTA DE SOUSA

DEFENDIDA EM 28 DE MARÇO DE 2017 E Aprovado COM CONCEITO..... A

O título foi alterado () não () sim _____

BANCA EXAMINADORA

Cláudio Carlos da Silva

Prof. Dr. Cláudio Carlos da Silva

PUC Goiás (Presidente)

Aparecido Divino da Cruz

Prof. Dr. Aparecido Divino da Cruz

PUC Goiás

Marc Alexandre Duarte Gigonzac

Prof. Dr. Marc Alexandre Duarte Gigonzac

Membro externo (UEG)

Dedico esta dissertação à minha mãe Bibiana (*in memoriam*)
e ao meu pai Vicente e à toda minha família, que me apoiaram
direta ou indiretamente na realização dos meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela sua presença constante em minha vida, pela força e luz para superar cada obstáculo e a Maria, mãe de Jesus, por ser minha intercessora cotidianamente;

Aos meus pais, Bibiana de Sousa (*in memorian*) e Vicente Batista de Sousa, por estarem sempre ao meu lado em todos os momentos da minha vida, pelo incansável incentivo aos meus estudos. Obrigada mãe! Obrigada pai!

Às minhas queridas irmãs Maria das Dores Moura Alves, Maria da Conceição Santos Moura, pelo amor, carinho e cuidado que sempre tiveram para comigo. Obrigada de coração;

Às minhas queridas sobrinhas Cleidiane Moura Alves da Silva, Danielly Moura Alves, Soraia Moura Alves e Valquíria Moura de Sousa, pelo amor, dedicação, força e apoio, e por não deixarem desistir dos meus sonhos. Obrigada!

Ao meu querido orientador, Professor Dr. Cláudio Carlos da Silva, pelo carinho, cuidado, paciência, disposição, conselhos, ensinamentos e correções. Pela oportunidade de estudo no Núcleo de Pesquisas Replicon e pelos momentos de descontração. Obrigada por tudo que fizeste por mim;

À minha querida co-orientadora, Professora Dra. Lysa Bernardes Minasi, por toda disponibilidade de ajuda no desenvolvimento deste estudo, pela dedicação, sugestões e competência. Muito obrigada!

Ao Professor Dr. Aparecido Divino da Cruz, PhD, agradeço pela participação da banca de qualificação e defesa, pelos momentos de alegria, ensinamentos, sugestões e correções às quais foram essenciais para aprimorar esta pesquisa;

Ao João Antônio Xavier Manso, MSc. e Damiana Mirian da Cruz e Cunha, MSc. pelo companheirismo, carinho, amizade, pela força e disponibilidade de ajuda em todos os procedimentos do laboratório ao longo desta pesquisa. Muito obrigada!

Ao Professor Marcks Wendhell Gonçalves, MSc. pela análise estatística dos dados para a qualificação do trabalho. Obrigada.

Aos professores e alunos do Laboratório de Pesquisas e Estudos de Produtos Naturais (ECMBF) da PUC Goiás, agradeço ao Dr. Leonardo Luiz Borges, Dr. Vinícius Barreto da Silva, Hiago Vieira de Jesus, Hugo Henrique Silva, pela contribuição na obtenção, padronização e caracterização dos extratos;

Aos Calebe Bertolino Marins de Campos, Jackeline Soares Fontes, Juliana Ferreira da Silva, MSc. Lilian de Sousa Teodoro, Lorrynne Guimarães Oliveira, Sabrina Sara Moreira

Duarte, Samara Socorro Silva Pereira, pessoas queridas, as quais admiro muito pela dedicação e presteza. Ainda agradeço a vocês pela amizade, momentos de alegria, companhia e colaboração prestada a este estudo.

Aos professores, técnicos, doutorandos, mestrandos, graduandos e estagiários do Núcleo de Pesquisas Replicon, em especial; Aldaires Vieira de Melo, Dr. Alex Silva da Cruz, Andreyra Gonçalves Costa, Alessandra Malta de Oliveira, Cristiano Luiz Ribeiro, MSc., Daniel Ferreira de Sousa, Esp. Eduardo Rocha Pedrosa, Irene Plaza Pinto, MSc., Nayara Lopes de Sousa, Thayzi Mendes Garcia, pelas palavras de incentivo, prontidão, amizade e contribuição no desenvolvimento do trabalho.

Ao Pe. Cícero Marcelino de Melo, Rita Milhomem da Silva e Gicelma Costa Veloso pelas orações, as quais me fortaleceram nas horas mais difíceis.

Ainda agradeço à Rita Milhomem da Silva, que por ter permitido a coleta do material biológico em sua propriedade.

À minha eterna amiga Zeaneçassea Viana Silva, companheira de lutas e sonhos, agradeço pela amizade, carinho, apoio e palavras motivadoras.

Ao meu amigo Roberto Coelho de Araújo, que mediou e me incentivou a abraçar o magistério. Obrigada amigo!

Ao Gerson Paulino Pereira e George Henrique Silva Santos, meus irmãos fraternos, agradeço pela comunhão de pensamento, amizade, dedicação e carinho.

Aos meus grandes amigos cidelândenses, Antônio José Rocha Silva, Antônia Dalva da Silva, Gilvan Ferreira Oliveira, Elke Oliveira Faustino, Emiriam Alves da Silva França, Francisco Andrade da Costa, Kátia Maria Horas, Loureço Bandeira da Silva, Maria Aparecida Horas, Marta Faustino, Maria Ivanilda Ferreira Siqueira, Mauro Sousa dos Santos, Nayara da Silva Sousa Gualberto, Raimunda França da Silva, e Valdemar Silva Santos, por todos os momentos vivenciados por nós. Obrigada pela amizade sincera.

Ao Núcleo de Pesquisas Replicon da PUC Goiás, pelo apoio material, instrumental e pelo espaço cedido para o desenvolvimento deste estudo.

À Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás (UFG) pelo processo de pulverização das cascas de inharé e dos frutos de jucá. Obrigada!

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG) pela concessão da bolsa de estudos.

“... Ainda que eu falasse as línguas dos homens e dos anjos, se não tiver amor, sou como bronze que soa, ou como o címbalo que retine.

Mesmo que eu tivesse o dom da profecia, e conhecesse todos os mistérios e toda a ciência; mesmo que eu tivesse toda a fé, a ponto de transportar montanhas, se não tiver amor, não sou nada.

Ainda que distribuísse todos os meus bens em sustento dos pobres, e ainda que entregasse o meu corpo para ser queimado, se não tiver amor, de nada valeria!

O amor é paciente, o amor é bondoso. Não tem inveja. O amor não é orgulhoso. Não é arrogante.

Nem escandaloso. Não busca os seus próprios interesses, não se irrita, não guarda rancor.

Não se alegra com a injustiça, mas se rejubila com a verdade.

Tudo desculpa, tudo crê, tudo espera, tudo suporta.

O amor jamais acabará...”

1Cor 13. 1-8.

SUMÁRIO

Lista de Figuras.....	XI
Lista de Tabelas.....	XIII
Resumo.....	XIV
Abstract.....	XV
1. Introdução.....	16
2. Referencial teórico.....	19
2.1. Plantas medicinais.....	19
2.1.1. <i>Caesalpinia ferrea</i> Mart.....	20
2.1.1.1. Enfoque botânico e fitoquímico da <i>C. ferrea</i>	21
2.1.2. <i>Brosimum gaudichaudii</i>	24
2.1.2.1. Enfoque botânico e fitoquímico de <i>B. gaudichaudii</i>	25
2.2. Mutagênese e genotoxicidade.....	26
2.2.1. Mutagênese de produtos derivados de plantas.....	28
2.2.2. Ensaio mutagênicos.....	30
2.2.2.1. Teste do Micronúcleo.....	30
2.2.2.2. Teste de <i>Allium cepa</i>	31
2.2.2.3. Ensaio Cometa.....	32
2.3. Organismo-teste.....	34
2.3.1. Gênero <i>Astyanax</i>	35
3. Objetivos.....	38
3.1. Objetivo geral.....	38
3.2. Objetivos específicos.....	38
4. Materiais e Métodos.....	39
4.1. Coleta do material botânico e preparação dos extratos vegetais.....	39
4.2. Testes fitoquímicos qualitativos.....	41
4.2.1. Teste para alcalóides.....	41
4.2.2. Teste de heterosídeos antraquinônicos.....	42
4.2.3. Teste de cumarinas.....	42

4.2.4.	Teste de heterosídeos flavonóides.....	42
4.2.5.	Teste para pesquisa de taninos.....	44
4.3.	Preparação das amostras e ensaios genotóxicos e mutagênicos.....	45
4.3.1	Teste de <i>Allium cepa</i>	46
4.3.2.	Teste do micronúcleo em linfócitos T humanos.....	47
4.3.3.	Teste do micronúcleo e anomalias nucleares em eritrócitos de <i>Astyanax</i> sp.....	47
4.3.4.	Ensaio Cometa em <i>Astyanax</i> sp.....	49
4.4.	Análise Estatística.....	50
5.	Resultados e Discussão.....	51
5.1.	Testes fitoquímicos qualitativos.....	51
5.2.	Teste de <i>Allium cepa</i>	53
5.3.	Teste do micronúcleo em linfócitos T humanos.....	57
5.4.	Teste do micronúcleo e anomalias nucleares em eritrócitos de <i>Astyanax</i> sp.....	58
5.5.	Ensaio cometa em <i>Astyanax</i> sp.....	62
6.	Conclusão.....	69
7.	Referências bibliográficas.....	71
8.	Anexos.....	90
8.1.	Anexo A – Aprovação do Comitê de Ética para <i>Astyanax</i> sp.....	90

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. *Caesalpinia ferrea* (jucá). Em [A] copa da árvore. Em [B] flores. Em [C] frutos verdes. Em [D] frutos maduros..... 22
- Figura 2. *Brosimum gaudichaudii* (inharé). Em [A] copa da árvore (parte superior do caule). Em [B] parte inferior do caule destacando as lesões caulinares resultantes da extração das cascas para o preparo dos produtos fitoterápicos... 24
- Figura 3. Espécime de *Astyanax* sp também conhecidos por lambaris, piabas ou tambius..... 36
- Figura 4. Mapa do Estado do Maranhão. Em destaque, a localização do município de Cidelândia, onde foram coletadas as amostras dos vegetais *Caesalpinia ferrea* (jucá) e *Brosimum gaudichaudii* (inharé)..... 39
- Figura 5. Preparação e processamento das amostras dos frutos de *C. ferrea* e das cascas de *B. gaudichaudii*. Em [A] separação das sementes dos frutos. Em [B] cascas fragmentadas. Em [C] amostras pulverizadas das cascas de *B. gaudichaudii* (inharé) e dos frutos de *C. ferrea* (jucá)..... 40
- Figura 6. Bulbos de *Allium cepa* (cebola) expostos às diferentes concentrações dos extratos vegetais. Em [A] *Brosimum gaudichaudii* (inharé). Em [B] *Caesalpinia ferrea* (jucá)..... 46
- Figura 7. Aclimação dos exemplares de *Astyanax* sp no Núcleo de Pesquisas Replicon da PUC Goiás..... 48
- Figura 8. Resultados dos testes para a detecção de alcalóides. Em [A] extratos dos frutos de *C. ferrea* (jucá). Em [B] extratos das cascas do caule *B. gaudichaudii* (inharé)..... 51
- Figura 9. Resultados dos testes para a detecção de heterosídeos antraquinônicos. Em [A] extratos dos frutos de *C. ferrea* (jucá). Em [B] extratos das cascas do caule *B. gaudichaudii* (inharé)..... 51
- Figura 10. Células meristemáticas de *Allium cepa* expostas às diferentes concentrações dos extratos de *Brosimum gaudichaudii* (inharé) e *Caesalpinia ferrea* (jucá). Em [A] metáfase normal. Em [B] anáfase normal..... 54
- Figura 11. Média dos índices mitóticos observados após o tratamento às diferentes concentrações do extrato etanólico das cascas do *B. gaudichaudii* (inharé)..... 55

Figura 12.	Média dos índices mitóticos observados após o tratamento às diferentes concentrações do extrato etanólico dos frutos do <i>C. ferrea</i> (jucá).....	55
Figura 13.	Frequências de células binucleadas com micronúcleos observadas após o tratamento às diferentes concentrações do extrato etanólico das cascas de <i>Brosimum gaudichaudii</i> (inharé).....	57
Figura 14.	Frequências de células binucleadas com micronúcleos observadas após o tratamento às diferentes concentrações do extratos etanólico dos frutos de <i>Caesalpinia ferrea</i> (jucá).....	57
Figura 15.	Células sanguíneas de <i>Astyanax</i> sp expostos ao extrato dos frutos de <i>Caesalpinia ferrea</i> (jucá) e extrato das cascas de <i>Brosimum gaudichaudii</i> (inharé). Em [A] eritrócitos normais. Em [B] eritrócito com micronúcleo (seta). Em [C] eritrócito binucleado. Em [D] eritrócito com anomalia nuclear tipo reniforme (seta). Em [E] eritrócito com anomalia nuclear tipo segmentado.....	59
Figura 16.	Médias das frequências de micronúcleos observadas em eritrócitos de <i>Astyanax</i> sp após a exposição às diferentes concentrações do extrato das cascas de <i>Brosimum gaudichaudii</i> (inharé).	59
Figura 17.	Médias das frequências de micronúcleos observadas em eritrócitos de <i>Astyanax</i> sp após a exposição às diferentes concentrações do extrato dos frutos de <i>Caesalpinia ferrea</i> (jucá).	60
Figura 18.	Resultados e médias das frequências de células com micronúcleos e alterações nucleares em eritrócitos de <i>Astyanax</i> sp observadas após a exposição às diferentes concentrações do extrato das cascas de <i>Brosimum gaudichaudii</i> (inharé).	61
Figura 19.	Resultados e médias das frequências de células com micronúcleos e alterações nucleares em eritrócitos de <i>Astyanax</i> sp observadas após a exposição às diferentes concentrações do extrato dos frutos de <i>Caesalpinia ferrea</i> (jucá).	62
Figura 20.	Núcleos de células sanguíneas de <i>Astyanax</i> sp expostos às diferentes concentrações de <i>B. gaudichaudii</i> (inharé) e <i>C. ferrea</i> (jucá). Em [A] núcleo sem danos genômicos. Em [B] núcleo exibindo danos genômicos moderados. Em [C] diversos núcleos exibindo danos genômicos intensos.	63
Figura 21.	Resultado do Ensaio Cometa para o parâmetro comprimento da cauda do cometa em células do sangue de <i>Astyanax</i> sp expostos <i>in vivo</i> às diferentes concentrações de <i>C. ferrea</i> (jucá).	65
Figura 22.	Resultado do Ensaio Cometa para o parâmetro momento da cauda de <i>Olive</i> em células do sangue de <i>Astyanax</i> sp expostos <i>in vivo</i> às diferentes concentrações do extrato de <i>C. ferrea</i> (jucá).	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Tipos de extratos dos frutos de <i>Caesalpinia ferrea</i> (jucá) e suas respectivas atividades biológicas.....	23
Tabela 2.	Indicações e forma de preparo das partes de <i>Brosimum gaudichaudii</i> (inharé) para tratamentos de doenças em humanos.....	25
Tabela 3.	Reações cromáticas de heterosídeos flavonóides.....	44
Tabela 4.	Resultados observados dos testes fitoquímicos nas amostras extrativas de <i>B. gaudichaudii</i> e <i>C. ferrea</i> , para a caracterização de alcalóides, antraquinônicos, cumarinas, flavonóides e taninos.....	52
Tabela 5.	Médias e desvios padrões dos parâmetros analisados pelo ensaio cometa para avaliação da genotoxicidade em sangue <i>Astyanax</i> sp expostos às diferentes concentrações de <i>B. gaudichaudii</i> (inharé).....	64
Tabela 6.	Médias e desvios padrões dos parâmetros analisados pelo ensaio cometa para avaliação da genotoxicidade em sangue <i>Astyanax</i> sp expostos às diferentes concentrações de <i>C. ferrea</i> (jucá).....	64

RESUMO

As espécies *Brosimum gaudichaudii* (família Moraceae) e *Caesalpinia ferrea* da família Fabaceae são amplamente distribuídas pelo território brasileiro e são consideradas plantas medicinais. O extrato das cascas de *Brosimum gaudichaudii* tem sido indicado para tratamento de mancha de pele e vitiligo. Por outro lado, o extrato dos frutos de *Caesalpinia ferrea* tem sido usado devido suas propriedades terapêuticas como ação antibacteriana, antiinflamatória e analgésica. A maioria dos fitoquímicos presentes nos extratos de plantas medicinais ainda não foram completamente estudados e podem ser tóxicos para a saúde humana e animal. Nesse sentido, é necessário estudos fitoquímicos qualitativos de metabólitos secundários e avaliação do potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico dos extratos destas espécies. Nesse estudo, visando avaliar os efeitos mutagênico e/ou genotóxico, diferentes concentrações das soluções extrativas de *B. gaudichaudii* e *C. ferrea* foram avaliadas *in vivo* em *Astyanax* sp e em *Allium cepa*, e em *ex vivo*, pelo teste de micronúcleos em linfócitos T humanos. Os resultados observados das análises foram submetidos ao teste não paramétrico Kruskal-Wallis e posteriormente a regressão linear simples com nível de significância 5%. O teste em *Allium cepa*, teste de micronúcleo em linfócitos T humanos e em eritrócitos de *Astyanax* sp não indicaram potencial mutagênico e/ou genotóxico dos fitoconstituintes ($p > 0,05$) quando comparado aos controles não expostos, exceto a concentração de 5g/L de *B. gaudichaudii* que apresentou citotoxicidade ($p = 0,038$). Por outro lado, o ensaio cometa, revelou ação genotóxica para todas as concentrações avaliadas no parâmetro comprimento da cauda do cometa, para o parâmetro momento da cauda de *Olive*, apenas a concentração de 20mg/L do extrato de *Caesalpinia ferrea* mostrou-se genotóxica. Nenhum dos parâmetros avaliados evidenciou danos genéticos resultantes da exposição aos extratos das cascas do caule de *B. gaudichaudii*. Portanto, as células meristemáticas apicais das raízes de *Allium cepa* e os linfócitos T humanos não apresentaram alterações genotóxicas e/ou mutagênicas induzidas pela exposição a ambos extratos vegetais que pudesse ser detectadas pelos testes do micronúcleos ou redução do índice mitóticos. Enquanto, nos eritrócitos de *Astyanax* sp foi evidenciado ação genotóxica pelo parâmetro comprimento da cauda do cometa e momento de da cauda de *Olive* somente para o extrato de *C. ferrea*. Diante do exposto, há necessidade de ampliar os estudos para melhor compreensão das atividades genotóxicas e/ou mutagênicas dos extratos de *B. gaudichaudii* e *C. ferrea* visando o estabelecimento de doses mais seguras para o consumo humano.

Palavras-chave: Genética; Pesquisa; Extratos vegetais; Plantas medicinais.

ABSTRACT

The species *Brosimum gaudichaudii* (family Moraceae) and *Caesalpinia ferrea* (family Fabaceae) are widely distributed throughout Brazil and are considered medicinal plants. The extract of *Brosimum gaudichaudii* bark has been indicated for the treatment of skin blemishes and vitiligo. On the other hand, the extract of *Caesalpinia ferrea* fruit has been used due to its therapeutic properties as antibacterial, anti-inflammatory and analgesic action. Much of the medicinal plant extracts constituents are unknown and may be toxic to human and animal health, so it is necessary to study the qualitative phytochemical of secondary metabolites and to evaluate the cytotoxic, genotoxic and mutagenic potential of the extracts of these species. In this study, in order to evaluate the mutagenic and / or genotoxic effects, different concentrations of the extractive solutions of *B. gaudichaudii* and *C. ferrea* were evaluated *in vivo* in *Astyanax* sp and *Allium cepa*, and *ex vivo*, by the micronucleus test in T lymphocytes humans. Data were submitted to Kruskal-Wallis a non-parametric test and then to simple linear regression with a significance level of 5%. The *Allium cepa* test, micronucleus test for human T lymphocytes and erythrocytes of *Astyanax* sp did not indicate mutagenic and / or genotoxic potential of phytochemicals ($p > 0.05$) when compared to the non-exposed controls, except the concentration of 5 mg/L of *B. gaudichaudii* that showed cytotoxicity. On the other hand, the comet assay revealed genotoxic action for all concentrations evaluated for the tail length parameter of the comet. For the moment parameter of Olive's tail only the 20mg /L concentration of *Caesalpinia ferrea* extract was genotoxic. Therefore, apical meristematic cells from the roots of *Allium cepa* and human T lymphocytes did not present genotoxic and / or mutagenic changes induced by exposure to both plant extracts detectable by micronuclei tests or mitotic index reduction. Genotoxic effect was evidenced by the tail length and tail moment parameter of Olive in the Comet Assay only for *C. ferrea* extract in the erythrocytes of *Astyanax* sp. In order to understand the genotoxic and mutagenic activities of *B. gaudichaudii* and *C. ferrea* it is important to increase the number of studies to establish safer doses for human consumption.

Key words: Genetics; Research; Plant extracts; Medicinal plants.

1. INTRODUÇÃO

A sociedade tem utilizado plantas medicinais desde os tempos ancestrais como estratégia para tratar ou prevenir doenças. A prática do uso de produtos derivados das plantas e o conhecimento acerca da sua aplicação com fins terapêuticos vêm sendo passado de geração a geração (CORRÊA; QUINTAS, 2008). A vivência e as observações populares sobre o uso e a eficácia de extratos vegetais contribuem para a divulgação de propriedades terapêuticas dos produtos e auxiliam na seleção de espécies para estudos farmacológicos e fitoquímicos (MACIEL et al. 2002).

As plantas medicinais são usadas constantemente com finalidade de auxiliar ou substituir as terapias convencionais no tratamento de diversas doenças. Essa preferência é decorrente da facilidade de obtenção das espécies medicinais. Por outro lado, o consumo de derivados de plantas necessita de atenção, pois várias plantas brasileiras não foram suficientemente estudadas no que se refere ao seu potencial toxicológico e/ou mutagênico (SIMÕES et al. 2003). Os fitoconstituintes são agentes xenobióticos, que apresentam produtos de biotransformação potencialmente tóxicos (LAPA et al. 1999).

O emprego da medicina popular, com base em conhecimento empírico, não é suficiente para validar as plantas medicinais como medicamentos seguros e eficazes. É necessário avaliar a relação entre o risco e o benefício do uso, por meio de estudos farmacodinâmicos e toxicológicos (FARIAS, 2007). O desconhecimento, por parte da população sobre possíveis efeitos secundários e tóxicos dos extratos vegetais, pode proporcionar graves consequências para a saúde humana a curto e a longo prazo (NAVARRO-MOL, 2000).

Apesar do avanço atual das pesquisas nas áreas da farmacologia, o consumo de substâncias derivadas de plantas deve ser monitorado por meio de ensaios que detectam efeitos tóxicos de tais substâncias, com intuito de alertar as pessoas sobre os possíveis riscos para o seu bem estar (BAGATINI et al. 2007).

Na Conferência Alma-Ata (1978), a Organização Mundial da Saúde (OMS) fez alusão sobre terapias em geral apresentando a integração da medicina tradicional à ocidental, a qual recomenda o uso de terapias alternativas como um conjunto de medidas para a melhoria da saúde e qualidade de vida da humanidade (BRASIL, 2006). Aproximadamente, 70-95% da população de países em desenvolvimento utiliza plantas medicinais como forma alternativa de terapia para as mais diversas doenças (OMS, 2011) e deste total, aproximadamente, 85% consomem produtos da flora local.

Segundo Vicentini e colaboradores (2001), os chás e as infusões de plantas medicinais podem conter compostos com efeitos mutagênico e teratogênico. Em contraste, tem sido também relatado que o uso de chás pode prevenir os efeitos de agentes mutagênicos sobre o organismo humano (SILVA et al. 2004). O estudo do potencial mutagênico de extratos vegetais é de fundamental importância para a produção de novos produtos com potencial terapêutico e também servir como um parâmetro de segurança para o uso desses produtos (PERON et al. 2008).

Conforme a ANVISA (2010), toda substância de plantas que precedem a síntese de compostos químicos com fins terapêuticos são consideradas medicinais. No entanto, a fácil acessibilidade a esses fitoconstituintes mantém o uso contínuo pelas pessoas, alicerçados na convicção de que extratos dessa natureza não possuem efeitos toxicológicos (MAGALHÃES et al. 2015).

Os bioindicadores são considerados importantes instrumentos utilizados no monitoramento de produtos que podem causar impactos ambientais como poluição do solo e contaminação da água, bem como para o biomonitoramento da interação entre um agente estressor e um organismo-teste mediante a identificação de alterações biológicas causadas pela exposição a produtos químicos com potencial mutagênico (SOUZA, 2006). Em geral, os bioindicadores são espécies que compõem um dado grupo taxonômico no ambiente, de origem nativa ou introduzida, que frequentemente são submetidos às diferentes concentrações do agente tóxico, por um determinado tempo (GHERARDI-GOLSTEIN, 1990). Entre os organismos-teste mais comuns encontram-se algumas espécies de peixes, como modelos animais aquáticos, e *Allium cepa*, como modelo vegetal (BELCAVELLO et al. 2012).

A análise de agentes mutagênicos em núcleos eucarióticos pode ser realizada aplicando-se métodos citogenéticos clássicos. Tais estudos citogenéticos informam sobre possíveis danos cromossômicos causados pela ação de agentes potencialmente tóxicos. O teste de micronúcleo tem sido utilizado por ser capaz de detectar tanto agentes clastogênicos quanto aneugênicos (RIBEIRO et al. 2003; ALBERTINI et al. 2000). Esse teste pode ser realizado em sistemas *in vitro* e *in vivo*, sendo um dos sistemas preferências para avaliar a indução de danos genéticos nos organismos (FIGUEIREDO, 2012).

O teste do micronúcleo em *Allium cepa* vem se destacando entre os testes citogenéticos aplicados para o estudo dos efeitos de extratos vegetais, visando a detecção de genotoxicidade (FACHINETO et al. 2007). Esse ensaio é suficientemente sensível para detectar alterações

cromossômicas causadas pela exposição às substâncias tóxicas, além de importância no monitoramento ambiental (FERNANDES, 2005).

O ensaio cometa é um método de investigação genotóxica que tem sido proposto para estudos de toxicogenética por ser altamente sensível. Este teste pode ser utilizado tanto em células de animais quanto em células vegetais, *in vivo* e *in vitro*. (SILVA et al. 2003; ANDERSON et al. 1998).

As plantas medicinais *Brosimum gaudichaudii* (inharé) é nativa do Cerrado brasileiro, com ocorrência em outras regiões do Brasil e *Caesalpinia ferrea* (jucá) é típica do Norte e Nordeste brasileiro (LORENZI, 2002; BRAGANÇA, 1996). Inharé e jucá são plantas muito utilizadas para tratar e curar doenças oriundas de ferimentos e manchas de pele (PEREIRA et al. 2006; HASHIMOTO, 1996).

A planta *Brosimum gaudichaudii* tem denominações diferentes, variando de uma região para outra. Nas regiões Norte e Nordeste é conhecido por inharé, na região Centro-Oeste por mama-cadela ou mamica-de-cadela. A planta é comumente usada na forma tópica, contra manchas de pele e vitiligo em todo território brasileiro (JACOMASSI; MOSCHETA; MACHADO, 2007). Por outro lado, o *Caesalpinia ferrea* vem se destacando em estudos farmacológicos por se tratar de uma planta com valor terapêutico. Chamada de pau-ferro ou jucá é amplamente utilizada na medicina popular para o tratamento de infecções do trato urinário, de reumatismo, diabetes e para o alívio da dor (OLIVEIRA et al. 2010).

Conforme Figueiredo (2012), é importante avaliar a atividade terapêutica de fitofármacos. Porém, também é importante proceder com estudos toxicogenéticos desses produtos para delinear a indução de possíveis danos genéticos em células que foram expostas e que, conseqüentemente, poderiam resultar em enfermidades, malformações congênitas entre outras.

Diante do exposto acima, o presente estudo aplicou os testes do micronúcleo em linfócitos T humanos e em eritrócitos de *Astyanax* sp, além da análise de anormalidades nucleares nesta espécie de peixe. Também foi realizado o ensaio cometa em células eritrocitárias da espécie *Astyanax* sp. Adicionalmente, foi empregado o teste de *Allium cepa* para estudos dos efeitos dos extratos etanólicos padronizados dos frutos de jucá (*C. ferrea*) e das cascas de inharé (*B. gaudichaudii*). Todos os ensaios visaram a avaliação do potencial mutagênico e genotóxico dos extratos dos frutos de jucá e das cascas do caule de inharé, além de contribuir para uma melhor compreensão dos efeitos biológicos dos fitoconstituintes no organismo humano.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Plantas medicinais

O uso de fitoconstituintes com finalidade terapêutica tem sido uma prática empregada há milhões de anos. Esta prática viabiliza descobertas de propriedades ativas, medicamentosas ou tóxicas, de várias plantas (COLAVITTI, 2002). O conhecimento adquirido acompanhou as transformações da terapêutica e a cada geração vem sendo repassado de forma cumulativa. Apesar dessa transferência de conhecimento de geração a geração sobre o uso medicinal de plantas, a maioria das espécies vegetais não foram suficientemente estudadas, principalmente, quando se trata do seu potencial mutagênico (MARQUES et al. 2003).

Para a Organização Mundial da Saúde (OMS), é fundamental a realização de estudos experimentais em plantas com fins medicinais, visando avaliar seus princípios ativos, garantindo padrão de segurança e comprovando sua eficácia terapêutica (SANTOS, 2004). Entre 70% a 90% da população de países em desenvolvimento depende essencialmente de substâncias de plantas medicinais para tratamento de doenças como gripes, diabetes, entre outras (OMS, 2011). Todavia, 80% da população mundial emprega práticas tradicionais na atenção à saúde e 85% dessa fração usa produtos de origem vegetal (OLIVEIRA et al. 2012).

As ações e programas para o uso de plantas medicinais prevista pelo Sistema Único de Saúde (SUS) são distribuídas de formas diferenciadas nas diversas regiões do Brasil, de acordo com seus biomas. A implementação dessas políticas públicas (Práticas Integrativas e Complementares) têm avançado nas últimas décadas valorizando a importância das plantas medicinais para a saúde humana (BRASIL, 2012).

Segundo Bruning (2012), o Brasil apresenta uma rica história sobre o uso de plantas no tratamento da saúde das pessoas. Com base na experiência, o conhecimento é acumulado e repassado oralmente, se concretizando na vivência das comunidades. Existem alguns tratamentos que têm sido usados de forma intensiva ao longo do tempo. Por outro lado a partir de meados do século XX, a prática de uso de fitoconstituintes com finalidade terapêutica tem se enfraquecido devido ao aumento do consumo e da disponibilidade dos medicamentos industrializados. Estima-se que, aproximadamente, 20% da população brasileira é responsável por 63% do consumo dos medicamentos produzidos pela indústria, o restante desse total recorre aos produtos naturais como única fonte de recurso terapêutico (SOARES, 2003).

A fitoterapia é a área da ciência que trata doenças por meio de plantas, a qual vem se desenvolvendo de maneira gradativa com resultados de novas pesquisas, destacando-se com informações sobre os efeitos de agentes terapêuticos, encontrados em produtos derivados de

vegetais, que por vez proporcionam alternativas de cura e/ou tratamento de enfermidades. Porém, os fitoterápicos, quando resultam da pesquisa fitoquímica, têm uma melhor valoração, pois possibilita o desenvolvimento para produção de novos medicamentos, oportunizando, a implantação de programas que tenham compromisso com a saúde humana, que sejam contínuos e eficientes no âmbito científico-tecnológico (YUNES, 2001).

O consumo de chás e infusões deve ser monitorado, visando alertar aos consumidores sobre os efeitos ou danos indesejáveis para a saúde. Já que estas pessoas estão frequentemente expostas à certas substâncias que podem ser potencialmente mutagênicas e/ou genotóxicas, devido a sua composição ou decorrente do metabolismo, e podem causar danos ao usuário. Conseqüentemente, o uso descontrolado de qualquer produto poderá trazer malefício à saúde do usuário (FUNARI; FERRO, 2005). Embora algumas substâncias naturais isoladas possam servir como molde para produção de novos fármacos, estudos acerca das suas propriedades vêm contribuir para o uso racional de produtos da flora (FABRI, 2012).

A tradição do uso de plantas medicinais no convívio da humanidade é respaldada pelo baixo custo dos produtos, aliados à convicção de que extratos naturais não promovem efeitos colaterais no organismo. No entanto, sabe-se que extratos vegetais podem provocar efeitos colaterais graves e possuem contraindicações, havendo necessidade de comprovação da qualidade e segurança destes produtos e também o estabelecimento de padrões de tratamento para seu uso seguro (MAGALHÃES, 2015). As plantas medicinais são consideradas agentes xenobiontes, que possuem efeitos de biotransformação potencialmente tóxicos, os quais podem ou não se manifestarem de imediatos ou permanecerem de forma assintomática por um longo período, dificultando assim a correlação com a sua ingestão (LAPA et al. 2004).

De acordo com Simões et al. (2007), para uma melhor garantia da qualidade de um produto advindo de planta e/ou medicamento fitoterápico, é preciso que haja padronização de todas as etapas de processamento, estabelecendo controle desde as fases de obtenção da espécie vegetal como o cultivo e colheita, transporte, secagem, moagem, armazenamento e elaboração da matéria-prima. Essas etapas são requisitos básicos para a obtenção de um produto de qualidade adequado para o consumo humano e animal.

2.1.1. *Caesalpinia ferrea* Mart.

A espécie *Caesalpinia ferrea* Mart. conhecida popularmente como jucá ou pau-ferro, é uma árvore nativa do Brasil amplamente distribuída em todo território nacional principalmente no Norte e no Nordeste. Esta planta tem ciclo de vida perene, pertence à

família Leguminosae (Fabaceae), que representa uma das maiores famílias dentre as cotiledôneas com cerca de 650 gêneros e 18.000 espécies, incluindo ervas, arbustos e árvores (RIBEIRO et al.1999).

A subfamília Caesalpinia possui aproximadamente 150 gêneros e 2.200 espécies, distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais (CAVALHEIRO et al. 2009). A espécie *Caesalpinia ferrea* Mart classifica-se categoricamente ao reino plantae, filo Magnoliophyta, classe Magnoliopsida, família Fabaceae e gênero Caesalpinia (DUARTE, 2010; ILDIS, 2007).

Dentre as propriedades terapêuticas de *Caesalpinia ferrea*, pesquisas apontam que extratos aquosos dos frutos de jucá, além de ser usados na prevenção de câncer (NAKAMURA, et al. 2002a), também possuem ação antibacteriana e antifúngica (XIMENES, 2004; LIMA et al. 1994). O jucá também tem sido usado para outros fins terapêuticos, como tratamento de afecções bronco-pulmonares, distúrbios gastrintestinais, diarreias, inflamações e infecções (MAGALHÃES, 2015).

2.1.1.1. Enfoque botânico e fitoquímico de *C. ferrea*

O jucá ou pau-ferro (*Caesalpinia ferrea* Mart.) é uma árvore que, dependendo da região, pode crescer de 10 a 30 metros de altura e atingir até 120 cm de diâmetro. É chamada de pau-ferro em razão da madeira ser muito dura e resistente. Suas folhas são compostas e pinadas, com folíolos de 5 até 8 pares e tamanho aproximado de 20 cm. Possui flores amarelas pequenas e em cachos, a planta tem a possibilidade de florescer na ausência das folhas. As que se encontram na Amazônia Central florescem entre os meses de março e abril e a frutificação ocorre entre maio e agosto (PORTELA et al. 2001). Os frutos são dispostos em vagens (legumes) de cor marrom escura, indeiscentes, duros, medindo aproximadamente 9,6 cm de comprimento, 2,1 cm de largura e 0,9 cm de espessura. Os frutos geralmente, apresentam de 3 a 9 sementes, pesando cerca de 8,67 g aproximadamente. As sementes são escuras, lisas e duras, medindo cerca de 1 cm de comprimento e pesando em média 0,20 g (DUARTE, 2010).

Conforme Nascimento e colaboradores (2002), no Nordeste, o jucá é considerado uma forrageira importante por se adaptar naturalmente à região e por fornecer forragem durante a seca. Por outro lado, os estudos agrônômicos demonstram uma planta com aparência ornamental, podendo ser cultivada em praças, jardins e quintais, com propagação realizada por sementes. O seu crescimento é rápido e a espécie pode ser consorciada com outras

plantas, destacando-se o potencial para combinar *C. ferrea* com outras espécies em sistemas agroflorestais (SOUZA, 2007). A disposição das folhas, frutos e flores estão apresentadas na Figura 1.

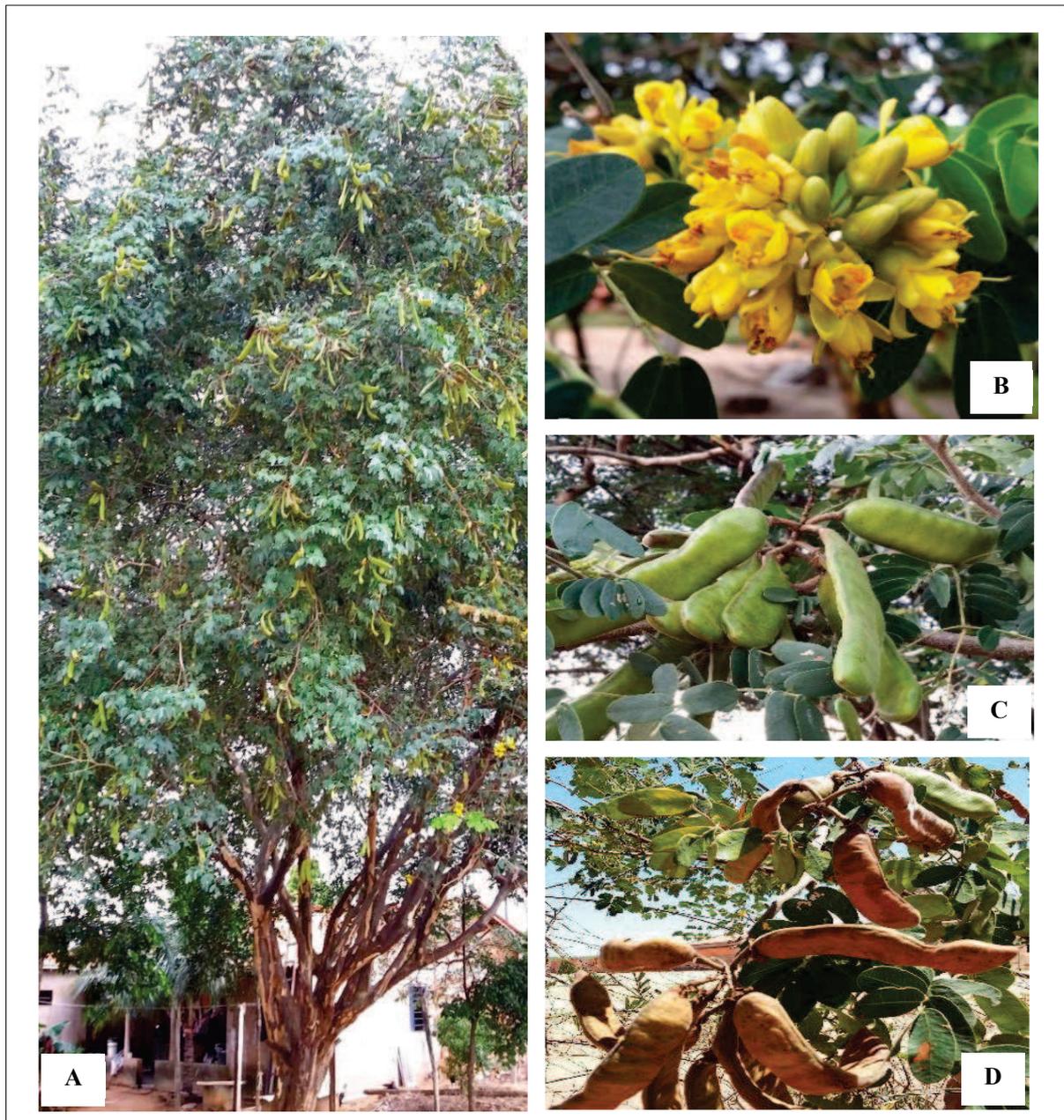


Figura 1. *Caesalpinia ferrea* (jucá). Em [A] copa da árvore. Em [B] flores. Em [C] frutos verdes. Em [D] frutos maduros.

Fonte: Acervo pessoal (2017).

A popularidade do uso do jucá (*Caesalpinia ferrea*) na medicina tradicional alavancou várias pesquisas para a investigação de novas propriedades terapêuticas, que tratasse de enfermidades dos pulmões e da boca, bem como ação sedativa, adstringente e antimicótica (BORRÁS, 2003; BRAGANÇA, 1996.). Além das propriedades descritas primeiramente,

inclui-se também a aplicação no tratamento de contusões (PINHEIRO et al. 2014; HASHIMOTO, 1996). Estudos das partes da *C. ferrea* e suas aplicações têm merecido a atenção de pesquisadores que investigam e avaliam atividades biológicas encontradas nas folhas, cascas, frutos, sementes, raízes e madeira. Todas essas partes têm sido usadas no tratamento de infecções, como na leishmaniose (BORRÁS, 2003; DI STASI et al. 2002). Dependendo da substância usada para a obtenção do extrato das partes desse vegetal como etanol, metanol ou água, pesquisas realizadas apresentam atividades biológicas também diferenciadas (SAMPAIO et al. (2009); NAKAMURA et al. 2002a).

Estudos do extrato aquoso do fruto de *C. ferrea* avaliaram a atividade anti-inflamatória e analgésica do extrato e demonstraram que o uso com dose de 0,3 g/kg por via oral ocasionou a redução do número de contorções abdominais em ratos Wistar, induzidas por ácido acético, de forma significativa (DUARTE, 2010; CARVALHO, 1993). Porém, estudos realizados com extrato etanólico revelaram atividades anti-inflamatória, hipoglicemiante e anticancerígena (NAKAMURA et al. 2002a; UEDA et al. 2001). A Tabela 1 representa de forma resumida as atividades biológicas de acordo com o tipo de extração dos extratos dos frutos de jucá.

Tabela 1: Tipos de extratos dos frutos de *Caesalpinia ferrea* (jucá) e suas respectivas atividades biológicas.

Parte	Tipos de extratos	Atividades biológicas	Referências
Frutos	Aquoso	Analgésica, anti-inflamatória	CARVALHO, 1996
	Etanólico	Analgésica, anti-inflamatória, hipoglicemiante, anticancerígena	UEDA et al. (2001); NAKAMURA et al. 2002
		Atividade inibitória tumoral em ensaio de ativação antigênica com vírus Epstein-Barr	NAKAMURA et al. 2002
	Metanólico	Leshmanicida	CORTEZ, 2004
		Antimicrobiana	SAMPAIO et al. 2009

Fonte: Adaptado de Duarte (2010).

A partir de estudos fitoquímicos de *C. ferrea*, foi isolado metabólitos secundários como ácido gálico e ácido elágico dos frutos secos (UEDA et al. 2001). Do caule foram obtidos flavonóides, compostos fenólicos, esteroides, saponinas, cumarinas, taninos e trímero de chalcona, chamado de paufferrol A (NOZAKI et al. (2007); GONZALEZ et al. 2004). Das

folhas foram isolados alfa e beta-amirina e lupeol (COELHO, 2004). Segundo Nakamura (2002), é possível que o metil-galato e o ácido gálico sejam responsáveis pelas atividades biológicas já que são os principais constituintes químicos encontrados nesse vegetal.

2.1.2. *Brosimum gaudichaudii*

A família Moraceae, conforme apresentado na Figura 2, compreende aproximadamente 50 gêneros e 1.500 espécies, com predominância nas regiões tropicais e subtropicais. No Brasil, é representada por 27 gêneros e abrange cerca de 250 espécies, integrando árvores, lianas, arbusto e ervas (LORENZI, 2005).

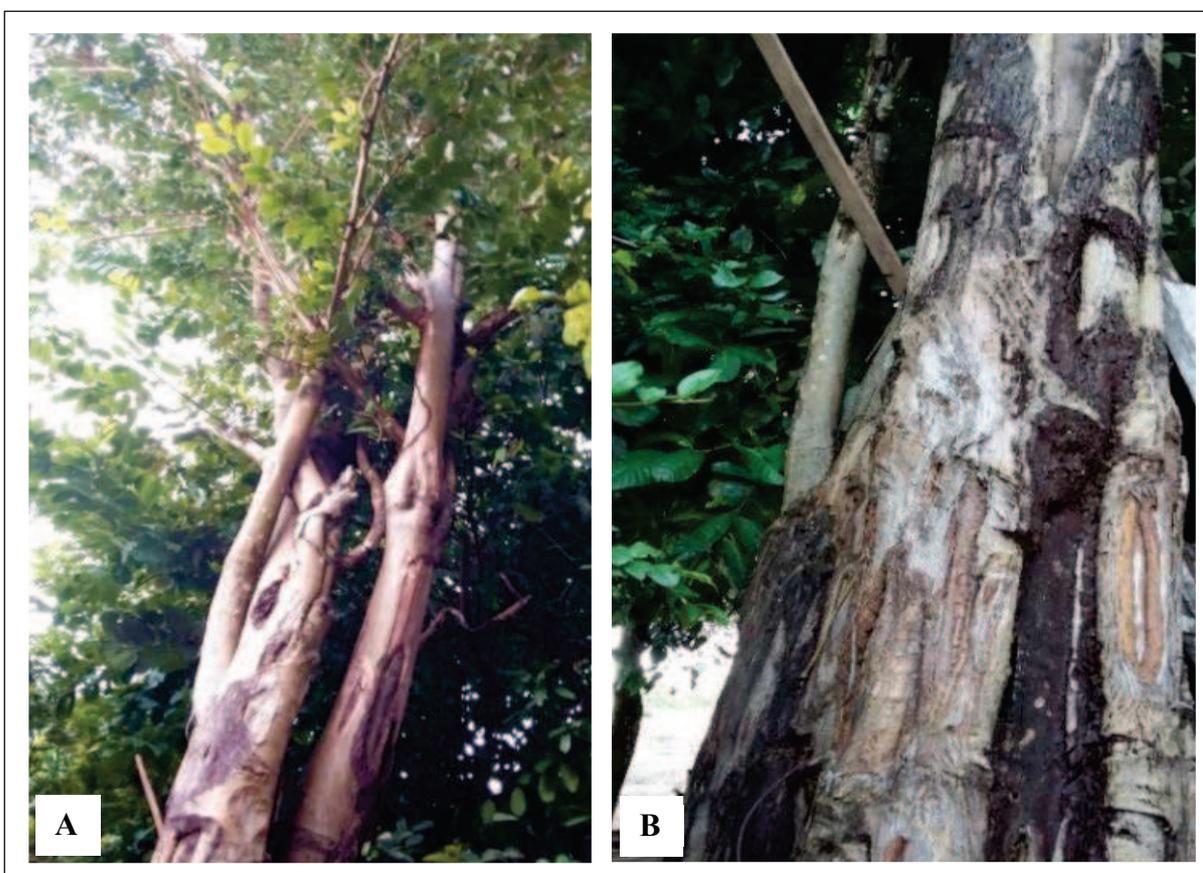


Figura 2. *Brosimum gaudichaudii* (inharé). Em [A] copa da árvore (parte superior do caule). Em [B] parte inferior do caule destacando as lesões caulinares resultantes da extração das cascas para o preparo dos produtos fitoterápicos.

Fonte: Acervo pessoal (2017).

Na família Moraceae inclui o *Brosimum gaudichaudii*, espécie nativa do Brasil, comum no Cerrado brasileiro, muito valorizada na medicina tradicional e na indústria medicamentosa (JACOMASSI, 2006). A espécie é popularmente conhecida como mamacadela, algodão-do-campo, inharé, entre outras denominações (PALHARES, 2004). Utilizada no consumo *in natura*, na construção civil e também na produção de papel (SANO,

ALMEIDA, 2008). As folhas e casca do caule são largamente empregadas na medicina popular em várias regiões do Brasil (LORENZI; MATOS, 2009).

Entre as propriedades terapêuticas do inharé, relatadas na literatura, incluem as indicações para o tratamento de macha de pele, depurativo do sangue, gripes e bronquites (RODRIGUES; CARVALHO, 2001). Porém, a indicação mais comum de seu uso é para o tratamento do vitiligo tendo a sua eficácia comprovada (FARIA et al. 2015). A Tabela 2 apresenta as indicações e partes usadas do inharé, além da forma de preparação de decoctos e infusões caseiras.

Tabela 2. Indicações e forma de preparo das partes de *B. gaudichaudii* (inharé) para tratamentos de doenças em humanos.

Indicações	Partes usadas	Preparo
Mancha da pele, vitiligo	Casca de ramos e raízes	Decocto ou infuso, 1 xícara de chá de raiz e casca do caule picados, diluir em 1 litro de água.
Depurativo do sangue, má circulação do sangue	Ramos com folhas	Decocto, infuso ou no vinho seco, 1 xícara de chá de folhas e ramos picados para 1 litro de água ou vinho, deixar repousar por 24 horas.
Gripes, resfriados e bronquites	Toda planta	Infuso, 1 xícara de chá da planta picada para 1 litro de água fervente, deixar repousar por 24 horas.

Fonte: Adaptado Rodrigues e Carvalho (2001).

2.1.2.1. Enfoque botânico e fitoquímico de *B. gaudichaudii*

Brosimum gaudichaudii (inharé) é uma espécie classificada como arbustiva, podendo atingir de 4 a 14m de altura, variando de uma região para outra. Segundo Almeida (1998), *Brosimum gaudichaudii* é uma planta monóica, suas flores são minúsculas e resultantes de inflorescências de coloração verde-amarelada, agrupadas aos pares na extremidade de pedúnculos nas axilas foliares. As folhas são simples, alternadas, de consistência firme, peciolada com a face inferior aveludada e na face superior com nervuras principais amareladas. Os frutos são de sabor adocicado, medindo em média de 4 a 5 cm de diâmetro, pode haver a ocorrência de até duas sementes por fruto (ALMEIDA, 1998). Os frutos são monocárpico, carnosos e globosos, destituído de endospermas (JACOMASSI, 2006;

LOURENZI; MATOS, 2002), do tipo drupa, de superfície verrucosa, coloração amarelolaranja com sementes de tonalidade creme (FARIAS et al. 2009).

O emprego farmacológico do inharé (*B. gaudichaudii*) é comum entre os brasileiros devido as suas propriedades medicinais, sendo prescrito para tratar machas da pele, sobretudo, o vitiligo. Ensaios fitoquímicos demonstraram que os princípios ativos responsáveis pela ação contra o vitiligo são duas furanocumarinas: psoraleno e bergapteno, ambas as substâncias presentes nas raízes desse vegetal. Os compostos furocumarinos tanto apresentam atividade para re-pigmentação de pele como atividade fungicida contra esporos de *Cladosporium sphaerospermum* (FARIAS, 2009; ALVES et al. 2000). Tais compostos podem ser conseguidos por síntese química, mas, é um processo dispendioso, podendo ser extraído facilmente de plantas como o *Brosimum gaudichaudii* (FARIAS, 2009; NEVES et al. (2002); PIMENTA, 2002).

Conforme Pozetti (2005) e Silva e colaboradores (2011), os aspectos químicos, toxicológicos e farmacológicos do inharé foram muito estudados propiciando validar sua atividade fotossensibilizante prescrita pelo exercício popular. As substâncias extrativas dessa planta podem atender às necessidades tanto como fitoterápico quanto como homeopático. A utilização de farmacógenos oriundos do inharé (*B. gaudichaudii*) via oral pode causar consequências adversas como dermatite de contato e, em especial, danos hepáticos (FARIAS, 2009; JACOMASSI, 2006).

2.2. Mutagênese e genotoxicidade

Os estudos mutagênicos permitem a investigação de processos de indução de danos no DNA pela ação de agentes físicos, químicos ou biológicos, que podem resultar em alterações genômicas. Os efeitos causados por esses agentes podem modificar componentes celulares e serem identificados como teratogênicos e genotóxicos (NUNES, 2000).

Todos os seres vivos são passíveis de mutações, sendo um dos processos fundamentais para a evolução e a diversidade das espécies. As mutações podem surgir espontaneamente ou serem induzidas pela exposição aos agentes conhecidos como mutagênicos (GRIFFITHS et al. 2001). Porém, algumas mutações não implicam em mudanças detectáveis no organismo ou na atividade metabólica das células. Outras afetam um número pequeno de regiões do genoma, quando ocorrem em genes específicos, podem determinar vantagens ou mediar um crescimento excessivo das células de um determinado tecido se o erro não for corrigido (RIBEIRO; MARQUES, 2003).

Costa e Menk (2000) relataram que mudanças no DNA induzidas por agentes químicos ambientais podem lesar processos vitais nas células, como a transcrição gênica e a replicação da molécula de DNA, favorecendo a morte celular ou o desenvolvimento de tumores. Os agentes mutagênicos, ao alterar o ciclo celular, podem induzir a formação de tumores, criando as condições para que a célula se reproduza descontroladamente, podendo invadir outros tecidos (ALMEIDA NETO et al. 2005).

Com base na literatura, as mutações promovem várias doenças entre elas o câncer, que por sua vez, podem ser induzidas pelas alterações no DNA em resposta à exposição a vários fatores como substâncias contidas em fitoconstituintes. No entanto, danos sofridos no DNA podem ser reparados pelos mecanismos de reparo do DNA. Se por ventura, houver a fixação de erros no DNA, a célula normal pode se tornar uma célula tumoral em consequência destes erros fixados tornando-se cumulativos (FIGUEIREDO, 2012).

A Genética Toxicológica tem por finalidade identificar a capacidade de indução de mutação por substâncias que agridem o DNA. A genotoxicidade de um produto é dada pelo aumento na quantidade de danos observados nos sistemas-testes (ZEIGER, 2007; SALVADORI et al. 2003).

Segundo Sisino e Oliveira-Filho (2013), a partir da Segunda Guerra Mundial, os estudos no campo da toxicologia foram impulsionados por causa do incremento exacerbado no uso de uma variedade de compostos químicos. Com a publicação do livro escrito pela americana Rachel Carson em 1962, o *best seller Silent Spring* (Primavera Silenciosa), pela primeira vez foram relatados os efeitos de substâncias químicas, como os agrotóxicos lançados no ambiente, sobre os organismos vivos, especialmente em pássaros. *Silent Spring* foi um dos grandes marcos da toxicologia ambiental. Os acontecimentos descritos no livro *Silent Spring* promoveram manifestações sociais e políticas, que estimularam o desenvolvimento de uma consciência coletiva acerca do impacto negativo causado pelas substâncias químicas aos componentes dos ecossistemas.

Com o passar do tempo, o desenvolvimento da toxicologia ganhou reconhecimento, estabelecendo-se em uma prática multidisciplinar, permitindo a complementariedade de conceitos de outras áreas, como medicina, biologia, química e farmácia. Na atualidade, a toxicologia apresenta uma nova visão de ciência integrada com o propósito de trabalho em conjunto, objetivando acima de tudo a proteção e a melhoria da qualidade de vida do ser humano e dos ecossistemas e seus constituintes (SISINNO; OLIVEIRA- FILHO, 2013).

A genotoxicidade refere-se a capacidade que alguns agentes têm de induzir alterações na sequência do DNA do organismo a eles expostos. A exposição a esses agentes pode afetar algumas funções celulares devidos as modificações na estrutura do material genético, possibilitando a indução de mutações (alterações permanentes). As mutações são responsáveis pelo desenvolvimento de câncer, por erros na embriogênese entre outros. Os agentes genotóxicos podem não ocasionar efeito diretamente deletério no organismo, se afetar as células germinativas, as mutações podem ser transmitidas às gerações subsequentes (GALVAN, 2011).

A genética toxicológica avalia os efeitos genéticos em potencial, que podem ser induzidos pela exposição humana, animal ou vegetal. Mutações são consideradas como pré-requisitos para o desenvolvimento de efeitos adversos à saúde humana (OLIVEIRA, 2012; RIBEIRO; MARQUES, 2003).

2.2.1. Mutagênese de produtos derivados de plantas

Desde os tempos mais remotos, os produtos naturais, principalmente os oriundos de plantas têm sido uma importante fonte de agentes terapêuticos. Aproximadamente 30% de todas as drogas acessíveis no mercado mundial são derivados de produtos naturais, incluindo plantas, animais e micro-organismos (CALIXTO, 2005; TEIXEIRA et al. (2003); VICENTINI et al. 2001). Atualmente, é comum o uso de várias plantas medicinais devido as suas propriedades terapêuticas, fato que populariza o seu uso como medicamento. Mas, apesar da crescente busca por produtos fitoterápicos, ressalta-se a necessidade de mais estudos que comprovem a segurança e a eficácia dos constituintes usados com finalidade terapêutica (TUROLLA, 2006).

Araújo e colaboradores (2014), relataram que a fitoterapia é o alicerce para a Etnofarmacologia, ciência que surgiu das relações entre povos e plantas. A Etnofarmacologia se fundamenta sobre a consolidação do conhecimento acerca dos princípios ativos usados para o tratamento dos agravos à saúde humana e animal, mediante a análise dos resultados nos variados campos da pesquisa, incluindo estudos químicos, toxicológicos e/ou farmacológicos.

Conforme Arora e colaboradores (2005), é fundamental estudar as plantas medicinais tradicionalmente empregadas na pesquisa para a produção de drogas com potencial quimioterapêutico e garantir medidas de segurança para o seu uso em comum e rotineiro.

Os efeitos de chás, infusões ou soluções extrativas de plantas medicinais deve ser monitorado utilizando ensaios toxicológicos, destacando-se os genotóxicos e/ou mutagênicos,

objetivando orientar os usuários sobre possíveis consequências para a saúde. Os usuários de produtos naturais estão frequentemente expostos a uma mistura complexa de substâncias, que podem ser mutagênicas e/ou genotóxicas, constituintes dos produtos ou decorrentes do próprio metabolismo. Este coletivo de substâncias podem causar danos genéticos e, conseqüentemente, resultar em malefícios e efeitos estocásticos sobre a saúde dos usuários. A investigação do potencial mutagênico das plantas é tanto importante para a produção de novas drogas terapêuticas quanto para o estabelecimento de medidas de segurança para adequação de seu uso, estabelecendo assim, normas cabíveis de controle e de qualidade para um dado produto (PERON et al. 2008).

Segundo Toledo (2003), a avaliação de substâncias isoladas, fracionadas ou extrativas dos fitoconstituintes ocorre em etapas, que podem incluir a caracterização da sua atividade biológica, a investigação sobre os mecanismos de ação atribuídos aos constituintes, a determinação do seu potencial tóxico, bem como da sua concentração ativa. Deve-se ressaltar ainda que as variabilidades quantitativa e qualitativa dos fitoconstituintes químicos podem ser reveladas em diferentes resultados de ensaios toxicológicos ou farmacológicos, que podem refletir sobre a segurança e a eficácia dos produtos designados para o consumo. Todavia, há a possibilidade de que compostos derivados de plantas possam englobar substâncias que exerçam efeitos colaterais não desejáveis para os usuários (SHAW et al. 1997).

Certamente, as plantas são capazes de produzir substâncias com potencial tóxico, decorrente do seu mecanismo de defesa contra alguns organismos predadores. Há relatos sobre indícios de efeitos deletérios de extratos de plantas no sistema biológico. Esta observação exemplifica o poder tóxico das plantas medicinais, contrariando a crença popular que extratos naturais só possuem propriedades benéficas para seus usuários (FIGUEIREDO, 2012).

Extratos vegetais apresentam uma diversidade química relevante e podem apresentar atividades mutagênicas. Do ponto de vista toxicológico, os efeitos podem não ser imediatamente correlacionados com a ingestão do produto, mas observado em longo prazo de forma assintomática, se concretizando em efeitos nefrotóxicos, neurotóxicos, hepatotóxicos ou até mesmo, carcinogênicos (LAPA et al. 2004).

Atualmente, há uma crescente exploração do conhecimento popular empírico por meio da pesquisa científica que fomenta a comercialização de plantas medicinais. O interesse na pesquisa científica tem sido alavancado por diversos fatores, entre eles, a demanda da

indústria farmacêutica por novas fontes naturais de medicamentos (MAGALHÃES et al. 2010).

2.2.2. Ensaios mutagênicos

Os ensaios mutagênicos têm importância para a avaliação do potencial de atividades mutagênica e/ou genotóxica dos agentes que podem lesionar o material genético. Os resultados dos testes de genotoxicidade e mutagenicidade fornecem parâmetros para a quantificação do risco de indução de danos ao DNA. Esses ensaios foram desenvolvidos para identificar e avaliar a capacidade mutagênica das substâncias químicas (OGA, 1996). São testes rápidos, que revelam danos cromossômicos ou lesões no DNA. Os testes mutagênicos têm sido aperfeiçoados nas últimas décadas com a finalidade de garantir a confiança dos seus resultados (TAKAHASHI, 2003).

A mutagênese tem se dedicado à pesquisa das propriedades e atividades mutagênicas e genotóxicas de agentes químicos, físicos e biológicos aos quais os organismos estão expostos. Em geral, a avaliação do dano genético é realizada na presença ou ausência de sistemas de metabolização, em diferentes tipos de ensaios como o teste do micronúcleo e o ensaio de cometa. Ambos os testes, além de ter a capacidade de detectar compostos indutores de danos no material genético, são essenciais na avaliação da segurança do uso de princípios ativos obtidos de plantas medicinais (AQUINO, 2010).

2.2.2.1. Teste do Micronúcleo

O teste do micronúcleo é um ensaio que permite avaliar danos genéticos e danos provenientes da ação de agentes clastogênicos, que quebram cromossomos, e de agentes aneugênicos, indutores de aneuploidia ou segregação cromossômica anormal (ANSARI et al. 2011). Essa técnica foi desenvolvida em eritrócitos de medula óssea de camundongo, sendo ultimamente empregada em diversos tipos de células (AQUINO, 2010).

O teste de micronúcleo tem sido recomendado para os estudos de biomonitoramento ambiental, por ser uma técnica simples, rápida, que avalia riscos associados à exposição aos agentes químicos, o qual pode ser repetido várias vezes para prevenção e monitoramento de organismos e ambientes (CARVALHO et al. 2002; HAYASHI et al. 1990). Na atualidade, o teste de micronúcleo vem sendo empregado para verificar a instabilidade genômica em células humanas, o mesmo pode ser realizado em linfócitos periféricos como em células epiteliais esfoliadas (SOUZA, 2016; CEPPI et al. 2010). O teste do micronúcleo pode ser aplicado a toda população de células, desde que estejam em divisão. O teste do micronúcleo é

recomendado para a avaliação do potencial mutagênico e também tem sido um teste recomendado para o registro de novos produtos químicos que entram no mercado mundial (RIBEIRO, 2003).

A formação de micronúcleos pode ser induzida por um conjunto de fatores de natureza externa como a radiação, microrganismos intracelulares e substâncias químicas, e de fatores de natureza interna como defeitos genéticos nos genes de reparo ou mudança no ciclo celular. Os eventos comprometem ou promovem falhas no DNA, impedindo-o de se corrigir possibilitando o surgimento de micronúcleos (SILVA, 2015; HUANG et al. 2011).

Os micronúcleos são pequenas estruturas delimitadas por membranas nucleares, correspondendo a fragmentos cromossômicos ou cromossomos inteiros perdidos do núcleo principal. Em geral, os micronúcleos possuem textura e cor similares ao núcleo principal. Para detecção do micronúcleo é necessário evidenciar características como: o micronúcleo ter em média de 1/16 a 1/30 de diâmetro do núcleo principal, não apresentar refringência; não estar ligado ao núcleo principal, a apresentar membrana nuclear intacta (FENECH, 2000).

De acordo com Salvadori e colaboradores (2003), o teste de micronúcleo em linfócito T evoluiu e as inovações propostas nos protocolos possibilitam avaliar a genotoxicidade de substância química. O resultado do teste do micronúcleo é simples e possui uma boa correlação com resultados de outros testes citogenéticos (SILVA, 2015; RIBEIRO, 2003).

2.2.2.2. Teste de *Allium cepa*

Os sistemas-testes que utilizam plantas superiores têm sido desenvolvidos como modelos de estudos para os efeitos de compostos extraídos de vegetais. As espécies *Vicia faba* e *Allium cepa* têm sido utilizadas para estimar a genotoxicidade e/ou a citotoxicidade de fitoconstituintes (DIAS et al. (2014); FACHINETTO et al. 2007). Tais sistemas-testes são de grande importância para o monitoramento da poluição ambiental e também na avaliação do potencial mutagênico de vários compostos químicos (BAGATINE, 2007; MA et al. 1995). O sistema-teste de *Allium cepa* é comumente usado na triagem de detecção de danos ao DNA (DIAS et al. 2014), o teste baseia-se em parâmetro de análise como por exemplo, células com pareamento heteromórfico de nucléolos (GROVER; KAUR, 1999).

O teste de *Allium cepa* tem se destacado entre os testes citogenéticos empregados para a investigação preliminar dos efeitos dos extratos vegetais por detectar eventos de toxidades. O teste de *Allium cepa* é rápido, eficiente, simples e econômico. Essa técnica permite avaliar alterações na divisão celular pela mensuração de danos em células meristemáticas devido às

boas condições de análise de seus cromossomos (LOUVATEL; ZAIONS; ARENHART, 2014).

Conforme Fachinetti (2007), o teste de *Allium cepa* foi validado pelo Programa Internacional de Segurança Química (IPCS, OMS) e pelo Programa Ambiental das Nações Unidas (UNEP), caracterizando-o como um teste eficiente para realizar a análise e o monitoramento dos danos induzidos às células, decorrentes da sua exposição aos compostos ambientais.

Segundo Vicentini e colaboradores (2000), o teste de *Allium cepa* foi validado mediante a obtenção de resultados similares aos de outros estudos que usaram modelos animais e outras espécies vegetais. Este ensaio também é bem aceito para o estudo de citotoxicidade de plantas medicinais, pois suas raízes ficam em contato direto com o fitoconstituente testado, permitindo avaliar diferentes concentrações do produto (DIAS et al. (2014); HERRERO et al. 2012).

2.2.2.3. Ensaio Cometa

O ensaio cometa, conhecido como eletroforese em gel de célula individualizada, é uma técnica que tem sido empregada para a detecção de danos primários no DNA. O ensaio cometa também encontrou ampla aplicação no monitoramento de efeitos induzidos por agentes alquilantes, intercalantes e oxidantes, devido à natureza do dano que provocam no DNA (TICE et al. 2002). O teste é de baixo custo, simples, sensível e adaptável para diversas espécies, tanto animal quanto vegetal (AQUINO, 2010; DHAWAH et al. (2008); COLLIN et al. 1996). O ensaio cometa é um método de investigação genotoxicológica, que pode mensurar possíveis danos no material genético de células isoladas, mediante a combinação entre técnicas bioquímicas e testes citogenéticos (CARITÁ, 2010; HARTMANN; SPEIT, 1997).

Ao passar dos anos, o ensaio cometa vêm sendo modificado, visando a melhoria da qualidade de detecção do dano genético. Modificações relevantes foram incorporadas por Ortling e Johanson, responsáveis pelo desenvolvimento da técnica de eletroforese em microgel, a inclusão de células lisadas, misturadas com agarose e submetidas à eletroforese em condições neutras, permiti a detecção de quebras das fitas duplas do DNA (ANDERSOM; YU; MCGREGOR, 1998). E modificações incorporadas por Singh e colaboradores (1988), que aperfeiçoaram a versão alcalina, permiti detectar quebras das fitas simples no DNA.

Posteriormente, Olive et al. (1990), otimizaram a técnica de lise celular em condições alcalinas com pH diferente da versão aperfeiçoada anteriormente.

O ensaio cometa desenvolveu-se de forma rápida, sendo bem aceito em diversas áreas do conhecimento, entre elas se destacam as aplicações em Biologia, Toxicologia e Medicina. A aplicabilidade do ensaio cometa tem crescido na atualidade pelo fato do ensaio avaliar os efeitos dos agentes genotóxicos sobre as células somáticas e/ou germinativas, tanto *in vivo* como *in vitro* (FRÖHNER, 2003; HARTMANN; SPEIT, 1997).

Ao ser comparado com outros testes, o ensaio cometa apresenta vantagens como a detecção de dano no material genético, exigência de poucas células para a sua realização e a possibilidade de se coletar dados de células individualizadas (BÜCKER et al. (2006); MITCHELMORE; CHIPMAN, 1998).

Segundo Kalantari e colaboradores (2013), o ensaio cometa é um teste muito usado na investigação de compostos farmacológicos por ser altamente sensível. O mesmo vem sendo considerado fundamental para os estudos de toxicogenética, devido às suas características e vantagens quando relacionado a outros testes de investigação de substâncias genotóxicas. Normalmente, é empregado para a detecção de lesões no genoma, que, ao se fixarem causam mutações. Todavia, essas lesões se diferem das mutações por serem passíveis de correções pelos sistemas de reparo do DNA (GOTIJO; TICE, 2003).

Entre as versões disponíveis do ensaio cometa, a mais empregada é a alcalina por ser mais abrangente. O teste alcalino requer pH maior que 13, com o propósito de induzir a desnaturação da molécula de DNA e detectar lesões de várias naturezas. A versão neutra, recorre-se de eletroforese em tampão de pH entre 7,0 e 8,5 para identificar quebras de fita dupla em DNA ou ligações cruzadas entre DNA e DNA, DNA e xenobiótico ou DNA e proteína (LIMA, 2016).

Conforme Gontijo et al. (2003) e Caritá (2010), o ensaio cometa tem sido satisfatório quando usado em peixes, revelando a sensibilidade das células sanguíneas desses animais aos efeitos genotóxicos causados por substâncias químicas diluídas nos sistemas aquáticos. Também é empregado cotidianamente em linfócitos de sangue periférico de mamíferos, em eritrócitos periféricos de anfíbios e répteis, por ser facilmente amostrado sem a necessidade de dissociação celular (DEVENTER; NACCI et al. 1996).

A análise do ensaio cometa pode ser realizada de duas formas: visual ou automatizada com o auxílio de um sistema de fotomicrografia e *software* específico. As duas formas de análise são concordantes em seus resultados. Para a análise dos cometas é necessário observar

seu tamanho, intensidade de fluorescência, entre outras características como a porcentagem de DNA na cauda do cometa e Momento da cauda de *Olive* (COLLINS, 2004; TICE, 1995). Ao interpretar os resultados, divide-se o cometa entre cabeça e cauda, levando-se em consideração o comprimento relativo da cauda para avaliar o nível do dano na célula. A célula sem ou com o mínimo de dano no DNA não apresentaria cauda, e mantém o núcleo intacto e arredondado. Por outro lado, as células que apresentarem maiores danos terão maiores caudas, similares a cometas invertidos (AQUINO, 2010). A cauda do cometa é formada por fragmentos de DNA resultantes de quebras de fitas simples e/ou duplas, que ao migrarem para fora do núcleo, constituem o formato de um cometa, correspondendo a desestruturação nuclear (DA SILVA; DA CRUZ, 2012).

2.3. Organismo-teste

Os organismos-teste são sistemas biológicos usados em ensaios genéticos para a avaliação de efeitos mutagênicos de substâncias químicas e para o monitoramento da qualidade ambiental. Os organismos agem como receptores biológicos diretos dos compostos químicos presente no ambiente (MA et al. 1995).

A toxicidade de substâncias é determinada com o auxílio de ensaios laboratoriais cujos permitem a observação dos efeitos adversos dos agentes testados, incluindo o seu potencial de letalidade. Os estudos de toxicidade devem ser desenvolvidos em condições específicas e controladas de acordo com as normas técnicas e consensos próprios. Os organismos-teste de experimentação devem ser padronizados. Várias são as espécies usadas e, dependendo do foco da investigação, a escolha do sistema-teste adequado é influenciada pela finalidade do estudo. Se o intuito é a proteção da saúde humana, geralmente são utilizados organismos vertebrados, como camundongos, coelhos entre outros mamíferos. Se o objetivo for para a proteção dos ecossistemas ou de seus componentes, comumente utilizam-se anfíbios, peixes, microcrustáceos, algas, minhocas e plantas (SISINNO; OLIVEIRA-FILHO, 2013).

Segundo a literatura, vários laboratórios de pesquisas científicas especialmente os de produtos naturais, têm inseridos em suas práticas diárias diversos testes biológicos, objetivando o monitoramento de estudo fitoquímico de extratos vegetais na busca de substâncias bioativas. A identificação de fitoquímicos com propriedades potencialmente tóxicas e genotóxicas pode ser realizada mediante a observação das alterações fisiológicas e celulares nos organismos-teste ou então pela estimativa das frequências de eventos, como a formação de micronúcleo e quebras induzidas nas moléculas do material genético (SOUZA et

al. 2006). A avaliação da genotoxicidade provinda dos resultados dos ensaios realizados, resulta em informações seguras e precisas quanto ao potencial de toxicológico e genotoxicológico dos agentes que ocasionam lesões no DNA (RIBEIRO et al. 2003).

Segundo Maroni et al. (2000), a exposição de um organismo às substâncias tóxicas pode induzir alterações na molécula de DNA, que estocasticamente possibilita a ocorrência de doenças como o câncer. O uso de bioindicadores constitui uma ferramenta importante para estudos ecotoxicológicos e toxicológicos, pois configura uma estratégia adequada na avaliação dos efeitos combinados entre compostos químicos e componentes biológicos, permitindo avaliar possíveis impactos potenciais das substâncias tóxicas aos organismos testados (FIGUEIREDO, 2012; KISS et al. 2003).

2.3.1 Gênero *Astyanax*

As águas neotropicais possuem a maior diversidade de peixes, compreendendo aproximadamente 6000 das 13000 espécies mundiais. Entre esse número, 2587 espécies de peixes pertencem a 39 famílias e 517 gêneros ocorrem exclusivamente em lagos, igarapés, lagoas, rios que constituem a hidrografia brasileira (PENTEADO, 2011).

O gênero *Astyanax* é um dos mais diversificados da família Characidae sendo apontado como polifilético com cerca de mais de 1100 espécies nominais válidas, estando amplamente distribuídos desde o sul do Estados Unidos da América até a América do Sul, representando uma ampla diversidade de tamanhos na maturidade, formas corporais e nichos ecológicos. Provavelmente esta distribuição pode ser devido a capacidade que o gênero *Astyanax* tem de se adaptar às diferentes condições ambientais (PENTEADO, 2011).

O gênero *Astyanax* foi proposto inicialmente por Baird e Girard em 1854. Posteriormente, este gênero foi revisado por Eigenmann, em 1921. Seis anos depois, Eigenmann realizou uma nova revisão do gênero *Astyanax* e validou 74 espécies e subespécies. No Brasil, na década de setenta, Gèry enumerou uma lista para o gênero *Astyanax* contendo 62 espécies e subespécies de água doce (ALMEIDA; VIEIRA, 2013).

De acordo com Lima e colaboradores (2003), uma revisão mais recente listou 90 espécies consideradas válidas na ictiofauna brasileira. Segundo Fernandes; Martins-Santos (2004), várias espécies do gênero *Astyanax* são morfologicamente semelhantes, o que dificulta a identificação desses animais, tornando a classificação taxonômica desse gênero muito complexa.

No gênero *Astyanax* se encontra a espécie *Astyanax* sp que foi descrita taxonomicamente por Garutti e Britski (2002), como espécie que pertence a Superclasse Osteichthyes, Classe Actinopterygii, Infraclasse Teleostei, Superordem Osthariophysi, Subsérie Characiphysi, Ordem Characiforme e Família Characidae (ALMEIDA; VIEIRA, 2013).

Wolff (2007), relatou que a espécie *Astyanax* é distribuída largamente pela bacia do rio Iguaçu sendo listada em estudo taxonômico referente aos Characiformes pertencentes a este local. Neste estudo foi encontrado seis novas espécie de lambaris as quais foram sinonimizadas em *Astyanax* sp a; sp b; sp c; sp d; sp e; e sp f, por se tratar de indivíduos distintos. Estas espécies de *Astyanax* citadas acima, ainda não foram descritas formalmente, no entanto, muitos pesquisadores já faz uso dessa nomenclatura (WOLFF, 2007; ABILHOA, 2004).

Os peixes da espécie *Astyanax* são conhecidos popularmente como matupiris na Amazônia, piabas no Nordeste e lambaris ou tambiús no Brasil meridional. Possuem como características morfológicas linha lateral completa, pré-maxilar não protrátil, dentes pré-maxilares dispostos em duas séries e dentes com cúspides (GIONGO, 2014). A Figura 3 mostra um espécime de *Astyanax* sp (lambari).



Figura 3. Espécime de *Astyanax* sp também conhecida por lambari, piaba ou tambiú.
Fonte: brasilienexkursion. Wordpress.com.

Os *Astyanax* têm importância ecológica como forrageiros de algumas espécies carnívoras (GURGEL, 2004). São de pequeno porte, atingindo até 20 cm de comprimento, chegando a pesar 40 gramas. Em geral, são encontrados vivendo em cardumes em cabeceiras de riachos, lagos e rios. Durante a reprodução, os cardumes realizam curtas migrações na época das cheias (MARCON, 2008).

Os *Astyanax* fazem parte da dieta alimentar humana. No entanto, possuem baixo valor comercial devido ao seu pequeno tamanho. Porém, são considerados importantes no equilíbrio dos ecossistemas e têm a capacidade de transformar partículas orgânicas em proteínas, além de serem um item primordial na nutrição dos piscívoros explorado comercialmente (DA SILVA et al. 2012).

Dentre os organismos aquáticos, os peixes são os mais utilizados em ensaios *in vivo* ou *in vitro* como bioindicadores de exposição aos agentes tóxicos. Normalmente, eles respondem a esses compostos por via similar a dos grandes vertebrados. Os peixes podem ser empregados em ensaios para testar substâncias químicas na avaliação do potencial carcinogênico ou teratogênico para humanidade. Os peixes como bioindicadores têm revelado resultados satisfatórios na avaliação dos efeitos de contaminantes químicos presente no ambiente aquático (RIVERO, 2007).

Segundo a literatura, o teste de micronúcleos em eritrócitos de peixes tem sido considerado como modelo experimental útil para a avaliação da contaminação de poluentes ambientais, bem como para identificação dos efeitos genotóxicos em ecossistemas aquáticos. Nesse sentido, micronúcleos em eritrócitos de peixes têm sido considerados bons indicadores para a investigação de mutagenicidade tanto *in situ* quanto *ex situ* (FERRARO et al. 2004).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Avaliar as atividades mutagênica e genotóxica de diferentes concentrações de extratos padronizados de *Caesalpinia ferrea* (jucá) e *Brosimum gaudichaudii* (inharé).

3.2. Objetivos Específicos

- Obter extratos padronizados de *Caesalpinia ferrea* e *Brosimum gaudichaudii* visando a prospecção fitoquímica qualitativa para identificação de metabólitos secundários.

- Analisar o potencial citotóxico e mutagênico dos extratos vegetais por meio da análise do índice mitóticos e alterações de migração cromossômica e demais alterações em células meristemáticas radiculares apicais de *Allium cepa*.

- Avaliar ação mutagênica dos extratos de *B. gaudichaudii* e *C. ferrea* utilizando teste do micronúcleo em linfócitos T do sangue periférico humano.

- Avaliar a genotoxicidade e/ou mutagenicidade dos extratos de jucá (*C. ferrea*) e inharé (*B. gaudichaudii*) utilizando teste do micronúcleo, alterações nucleares e ensaio cometa, em eritrócitos da espécie *Astyanax* sp.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Coleta do material botânico e preparação dos extratos vegetais

Os materiais botânicos foram coletados *in situ* em Cidelândia, localizada no Sul do Maranhão, conforme mostra a Figura 4.



Figura 4. Mapa do Estado do Maranhão. Em destaque, a localização do município de Cidelândia, onde foram coletadas as amostras dos vegetais *Caesalpinia ferrea* (jucá) e *Brosimum gaudichaudii* (inharé).

Fonte: Abreu (2006)

O ponto da coleta encontra-se nas coordenadas S 5.178251° O 47.785983° e S 5.10417° O 47.47095°. Os espécimes locais são fontes de matéria prima para a população cidelândense, que frequentemente busca os frutos de *Caesalpinia ferrea* (jucá) e a casca de *Brosimum gaudichaudii* (inharé) para preparar infusões ou extratos aquosos.

Após a coleta, os frutos e as cascas foram lavados em água corrente, colocados em posição vertical para evaporação da água e no dia seguinte trazidos para Goiânia Goiás e mantidos em refrigerador a 4-8°C no Núcleo no Pesquisa Replicon da Escola de Ciências Agrárias e Biológicas (ECAB) da Pontifícia Universidade Católica de Goiás. Posteriormente, a matéria prima foi transferida para o Laboratório de Pesquisa e Estudo de Produtos Naturais da Escola de Ciências Médicas, Biomédicas e Farmacêuticas (ECMBF) da PUC Goiás para a realização de prospecção fitoquímica qualitativa.

As amostras foram colocadas em estufa com temperatura de 45°C, sendo monitoradas a cada 72 horas no início e depois a cada 24 horas, exceto nos finais de semana, por um período de 20 dias. Em seguida, as sementes foram retiradas dos frutos com o auxílio de um pistilo de vidro e as cascas foram quebradas em fragmentos menores. Ao terminar a separação das sementes contidas nos frutos, as amostras foram reduzidas a pó, conforme mostrado na Figura 5.

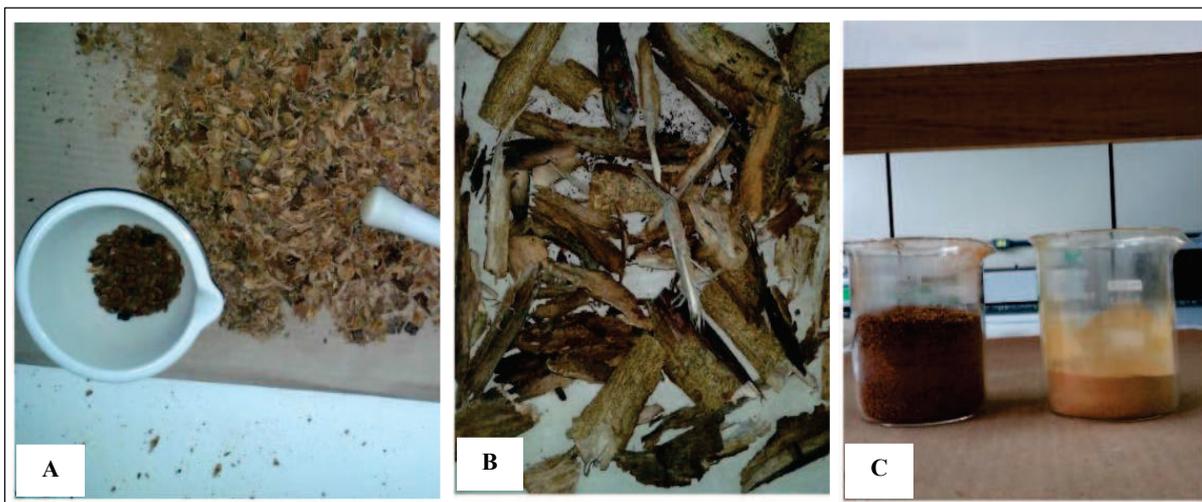


Figura 5. Preparação e processamento das amostras. Em [A] separação das sementes. Em [B] cascas fragmentadas. Em [C] amostras pulverizadas de cascas de inharé e frutos de jucá respectivamente. Fonte: Acervo pessoal (2017).

O processo de pulverização das amostras foi realizado na Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás (UFG), realizado em um moinho de navalhas. Em seguida, foi pesado 300g de pó de cada amostra para realização do teste de umidade e prospecção fitoquímica.

Posteriormente, iniciou-se o processo de percolação para a obtenção dos extratos, foram separados 160g de cada amostra pulverizada, correspondendo aos frutos e às cascas. Em béqueres, as amostras foram homogeneizadas por adição de álcool 70%. As misturas foram transferidas para percoladores forrados com filtro de papel e algodão umedecidos com álcool.

Posteriormente, em cada amostra, foram adicionados 800 mL de álcool 70%. Esta preparação levou cinco dias para ser filtrada totalmente. Após esse período, as amostras dos extratos foram concentradas em um rotaevaporador por seis horas. Os extratos foram acondicionados em recipientes protegidos da luz e guardados em refrigerador a temperatura aproximada de 4 a 8°C.

4.2. Testes Fitoquímicos Qualitativos

No Laboratório de Pesquisa e Estudo de Produtos Naturais da PUC Goiás foram realizados os testes fitoquímicos qualitativos segundo o manual de protocolo do Laboratório e de acordo com MATOS, (1988). Os testes visavam verificar a presença de classes de metabólitos secundários como alcalóides, antraquinônicos, cumarinas, flavonóides e taninos nas amostras extrativas das cascas de inharé (*B. gaudichaudii*) e dos frutos de jucá (*C. ferrea*).

4.2.1. Teste para alcalóides

Para a realização do teste para alcalóides, foram pesados 2g de pó de cada amostra e transferidos para duas cubas de porcelana. Em seguida, foram adicionados 20 mL de ácido sulfúrico a 5% em cada cuba, as quais foram fervidas por 3 minutos. Após a fervura, as misturas foram filtradas em algodão e, imediatamente, resfriadas. Posteriormente, o filtrado foi transferido para funis de separação e alcalinizado com hidróxido de amônia a 10%. Após, fez-se extração com duas porções de 10 mL de clorofórmio. As frações de clorofórmio foram filtradas em algodão e, em seguida, evaporadas em um evaporador rotativo (TE – 211 Tecnal).

Os filtrados extrativos foram diluídos em 2 mL de ácido sulfúrico a 5%, e posteriormente, em 5 lâminas, foram distribuídas 3 gotas de cada filtrado, juntamente com 6 gotas dos reagentes de Mayer, Dragendorff, Bertrand e Hager, separadamente, em cada uma delas. Após 5 minutos, foi verificado se houve a formação de precipitado na amostra dos frutos de jucá e das cascas de inharé.

4.2.2. Teste de heterosídeos antraquinônicos

Ao realizar o teste para a extração de possíveis heterosídeos antraquinônicos, foi utilizado 1g de cada amostra pulverizada, transferidos para dois béqueres de 100 mL, foram adicionados 30 mL de álcool a 75% em cada uma das amostras, que foram fervidas por 3 minutos. Em seguida, filtradas e resfriadas à temperatura ambiente.

Dos líquidos obtidos, foram aliqotados 10 mL de cada um dos filtrados, e transferidos para béqueres de 40 mL, os quais foram identificados como extrato (I) e extrato (II) para a realização da caracterização dos metabólitos secundários. O béquer com extrato (I) foi acidificado com 0,5 mL de ácido clorídrico a 10%. O béquer com o extrato (II) não foi acidificado, ambos foram levados à fervura durante 2 minutos. Em seguida, os líquidos foram transferidos para tubos de ensaio previamente identificados e adicionados a cada um dos tubos 10 mL de éter sob agitação leve.

Posteriormente, foram suspensos 5 mL de cada tubo de ensaio e transferidos para novos tubos com a mesma identificação. Em ambos, foram acrescentados 4 mL de amônia SR (NH₄OH) a 10%. Os tubos foram deixados em repouso por 5 minutos.

A camada amoniacal desenvolveu uma coloração que variou do róseo ao vermelho escuro, formando um anel, conforme a quantidade de princípio ativo presente na amostra. O aparecimento da cor caracteriza uma reação positiva para heterosídeos antraquinônicos.

4.2.3. Teste de cumarinas

Para extração de cumarinas, foram usados 2g de cada uma das amostras, colocados em dois béqueres e acrescentado em cada amostra 30 mL de água quente. Em seguida, as misturas foram filtradas e adicionadas 1 mL de ácido clorídrico a 1N até a redução do pH para 1.

Posteriormente, foram transferidas para funis de separação e extraídas com 10 mL de éter. O volume dos extratos etéreos foi reduzido à metade. Em seguida, foram gotejados sobre papel de filtro e acrescentado uma gota de hidróxido de sódio 1N em uma das regiões onde foi aplicada a solução extrativa e observada na câmara de luz UV. A fluorescência verde indica reação positiva para a caracterização de metabólitos secundários.

4.2.4. Teste de heterosídeos flavonóides

Para extração de heterosídeos flavonóides foram utilizados 7g das amostras pulverizadas, que foram transferidos para dois béqueres, acrescentado em cada 60 mL de

etanol a 70%, fervidas por 5 minutos. Após esse período, foram filtradas em papel de filtro previamente umedecido com etanol a 70%. Os filtrados obtidos foram usados para a realização dos testes de caracterização de heterosídeos flavonóides e de hidroxilas fenólicas, utilizando as seguintes reações: cianidina, oxalo-bórica, ácido sulfúrico concentrado, hidróxidos alcalinos, cloreto de alumínio e cloreto férrico.

Na reação de cianidina, transferiu-se 3 mL de cada um dos filtrados para os tubos de ensaios e mergulhou-se em cada um deles 1 cm de fita fina de magnésio cortada em pedacinhos. Em seguida, acrescentou-se aos tubos 1 mL de HCl concentrado com cuidado, observando a coloração das misturas. O surgimento da coloração vermelha confirma a presença de heterosídeos de flavonóides na amostra.

Para a reação oxalo-bórica, foi evaporado em cápsulas de porcelana 5 mL das soluções extrativas, usando chapa aquecida a 200°C e adicionado aos resíduos semi-secos 3 mL de solução de ácido bórico a 3% e 1 mL de ácido oxálico a 10%, evaporados até a secura. Acrescentou-se aos resíduos secos, 7 mL de éter etílico. Para a observação de fluorescência, a solução foi colocada sob iluminação com luz ultravioleta.

Na reação com ácido sulfúrico concentrado, foram transferidos 3 mL de cada solução extrativa para duas cápsulas de porcelana. Em seguida evaporadas até a semi-secura usando chapa aquecedora (208D ethiktechnology) a 200°C. Em seguida, juntou-se 0,5 mL de ácido sulfúrico concentrado nas amostras que foram observadas sob luz ultravioleta, verificando se houve desenvolvimento de fluorescência.

Ao caracterizar as hidroxilas fenólicas, geralmente realizam-se três reações: com hidróxidos alcalinos, com o cloreto de alumínio e com cloreto férrico.

Para a reação com hidróxidos alcalinos, foram transferidos 3 mL das soluções extrativas para dois tubos de ensaios e acrescentado aos tubos 1 mL de NaOH a 20% e agitou-se os tubos. Em seguida, foi observada a cor desenvolvida. A presença da coloração amarela, caracteriza a reação positiva de heterosídeos flavônicos nas amostras.

Para a reação com o cloreto de alumínio, depositou-se 5 mL de cada amostra extrativa em dois béqueres de 10 mL e transferiu-se separadamente, para dois pedaços de papel filtro, espalhando-as por toda a superfície. Em seguida, foram umedecidas uma das regiões dos papéis com solução de cloreto de alumínio a 5%. Posteriormente, observou-se a fluorescência desenvolvida sob luz ultravioleta. O desenvolvimento de fluorescência amarela intensa caracteriza presença de flavonóides.

Por fim, na reação com o cloreto férrico, foram utilizados 3 mL de cada uma das soluções extrativas e transferidas para dois tubos de ensaios. Acrescentou-se 2 gotas de cloreto férrico a 4,5% e observou-se o aparecimento da coloração verde, amarela ou castanha escura. O desenvolvimento dessas colorações nas amostras indica reação positiva.

Os heterosídeos flavonóides possuem agliconas, derivadas de núcleos de chalconas, diidrochalconas, flavonas, flavanonas, isoflavanonas entre outras, como mostra a Tabela 3. A identificação desses metabólitos é observada pela presença de fluorescência ou coloração desenvolvida na solução em estudo.

Tabela 3. Reações cromáticas de heterosídeos flavonóides

Reação	Flavonas	Flavonóis	Flavanonas	Chalconas	Isoflavonas
Cianidina	Laranja	Vermelha	Violeta	-	-
Oxalo-bórica	-	Amarelo- Verde	-	-	-
NaOH	Amarela	Amarelo-Escura	Amarela	Amarela	Amarela
FeCl ₂	Verde	Verde-Castanha	Verde-Castanha	Amarela	Verde
AlCl ₃	Amarelo-Verde	Amarela	Azul-Verde (Uv)	Amarela	Amarela-Castanha

Fonte: Paula e Barra (2005).

4.2.5. Teste para pesquisa de taninos

Para a detecção de taninos foram utilizados 2g de cada amostra pulverizada e adicionados de 50 mL de água destilada em cada uma. Posteriormente, foram levadas à fervura por 5 minutos. Em seguida, as amostras foram filtradas em papel filtro ainda quente e completado o volume de cada amostra para 100 mL. Depois foram montadas duas baterias contendo 6 tubos de ensaios em cada uma. Em seguida, 5 mL das soluções extrativas foram adicionadas a cada tubo e seguiu-se com as seguintes reações: reações com gelatina, sulfato de quinina, acetato de cobre, hidróxido de sódio e cloreto férrico.

Na reação com gelatina, adicionou-se no primeiro tubo de ensaio 5 gotas de gelatina a 2,5% em solução de cloreto de sódio a 5%. Em seguida, fez-se análise para identificar se houve o desenvolvimento de precipitado branco. A presença de precipitado traz como indicativo reação positiva para taninos.

Para a reação de sulfato de quinina, no segundo tubo de ensaio adicionaram-se 5 gotas de solução de sulfato de quinina a 1%. Observou-se houve a presença de precipitado nas amostras. Já no terceiro tubo foram acrescidos 5 gotas de solução alcoólica de brucina e observado o aparecimento de precipitado. O surgimento de precipitado na amostra indica a presença de taninos.

Na reação com acetato de cobre, foram adicionadas, no quarto tubo de ensaio, 5 gotas de acetato de cobre a 4% e, no quinto tubo, 2 gotas de cloreto férrico a 2%. Em seguida, observou-se em cada uma das amostras se houve a formação de precipitado. Posteriormente, as misturas foram diluídas com 10 mL de água destilada. Observou-se a cor desenvolvida em cada uma.

No sexto tubo destinado a reação com hidróxidos sódio, depositaram-se 5 gotas de solução de hidróxido de sódio a 20%. Em seguida, verificou-se em cada uma das amostras se escureceram. A presença de tanino é observada pelo escurecimento da amostra.

Nas reações para caracterização de taninos, paralelamente, foi preparado um tubo controle para cada uma das reações. Foram usados 5 mL de ácido tânico a 0,5% para cada um dos seis tubos. Posteriormente, comparou-se os tubos-controles com os reagentes da reação correspondente.

4.3. Preparação das amostras e ensaios genotóxicos e mutagênicos

A preparação das amostras extrativas dos frutos de jucá e das cascas de inharé foi realizada no Núcleo de Pesquisas Replicon da PUC Goiás. Nesta preparação, foram utilizados 5g/L dos extratos padronizados dos frutos de *C. ferrea* e das cascas de *B. gaudichaudii* conforme recomendação da Sociedade Brasileira de Mutagênese e Teratogênese, quando não se tem uma dose pré estabelecida.

As amostras foram transferidas separadamente para dois erlenmeyeres de 1000 mL. Em seguida, foi adicionado um litro de água da torneira em cada um dos recipientes. Depois, as soluções foram solubilizadas com a utilização do agitador magnético por um período de 4 horas para cada uma das amostras. Esse processo foi realizado para a preparação dos extratos utilizados no teste de *Allium cepa*.

Para os demais testes, seguiu-se o mesmo padrão de preparação descrita anteriormente, exceto a substituição da água da torneira por água destilada e depois microfiltrada por duas vezes em filtros de membranas PES de baixa afinidade, modelos K18-430 poro 0,45µm e K18-230 poro 0,22µm (KASVI). Posteriormente, as amostras que foram

utilizadas no teste de *Allium cepa* e demais testes foram transferidas para tubos eppendorfs e mantidas em refrigerador a 4-8°C.

4.3.1. Teste de *Allium cepa*

A metodologia utilizada para a realização do teste de *Allium cepa* seguiu a técnica descrita por Fiskesjö (1993) com modificações. Foram retiradas as raízes e catáfilos dos bulbos das cebolas que foram colocadas em béqueres com água fresca da torneira para o enraizamento dos bulbos em temperatura ambiente. Posteriormente foram coletadas algumas raízes, sem a exposição aos extratos, sendo consideradas como grupo controle negativo.

As demais raízes foram expostas por 24 horas nas soluções extrativas em 4 diferentes concentrações, correspondendo a 1,25g/L; 2,5g/L; 3,7g/L; 5g/L. Após 24 horas de exposição, removeu-se o restante das raízes expostas aos tratamentos visando avaliar as alterações celulares induzidas pela exposição aos fitoconstituíntes.

Após a exposição, raízes foram fixadas em metanol e ácido acético (fixador de Carnoy) e mantidas em refrigerador à temperatura de aproximadamente 6°C. Posteriormente, as raízes foram colocadas por 15 minutos em solução de hidrólise de HCl 1N à temperatura ambiente e coradas pela reação de Feulgen. Em seguida foi retirado 2 mm dos ápices meristemáticos e colocados em lâminas codificadas e esmagados em ácido acético (0,45M).

A análise das lâminas foi realizada aleatoriamente, sem o prévio conhecimento dos tratamentos, utilizando microscopia de luz branca com objetiva de 40X. Foram analisadas 1000 células interfásicas para cada tratamento, totalizando 10.000 células para cada uma das amostras extrativas. Os parâmetros de análise foram baseados em padrões nucleares atípicos como quebra cromossômica, redução do índice mitótico, erros de migração cromossômicas em metáfases e anáfases e binucleações. A exposição dos bulbos, às diferentes concentrações de extratos padronizados das cascas de *B. gaudichaudii* (inharé) e dos frutos de *C. ferrea* (jucá) está apresentada na Figura 6.

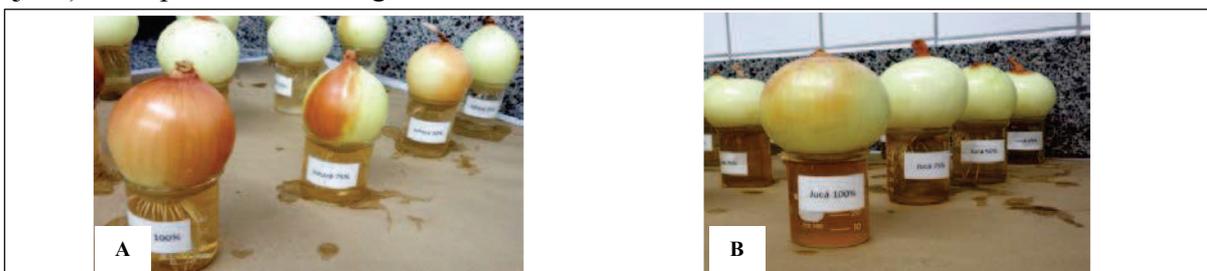


Figura 6. Bulbos de *Allium cepa* (cebolas) expostos às diferentes concentrações dos extratos vegetais. Em [A] *Brosimum gaudichaudii* (inharé). Em [B] *Caesalpinia ferrea* (jucá).

Fonte: Acervo pessoal (2017).

4.3.2. Teste do micronúcleo em linfócitos T humanos

Para a realização do teste de micronúcleos em linfócitos T humanos, o sangue foi coletado de indivíduos voluntários, de 19 a 36 anos, saudáveis sem histórico de uso de drogas ilícitas e não estavam sob efeitos de medicamentos.

O protocolo de cultura celular seguiu a adaptação do método para obtenção de micronúcleos em linfócitos binucleados (DA CRUZ et al. 1994). Para a realização do teste de micronúcleo em linfócitos humanos, foram utilizadas três concentrações dos extratos *C. ferrea* e *B. gaudichaudii*, correspondentes a 0,039g/L; 0,078g/L e 0,156g/L. O grupo controle não foi exposto aos extratos vegetais.

As culturas inicialmente foram preparadas com meio completo para sangue periférico, 4,5 mL de RPMI; 1mL de soro fetal bovino; 100µL de L-glutamina; 100µL fitohemaglutina; 1mL de sangue e os extratos vegetais nas concentrações descritas anteriormente, e colocados em estufa a 37°C a 5% de CO₂ por 44 horas. Após esse período, foram adicionados 10µL de citocalasina B em cada cultura. As culturas foram devolvidas à estufa até completar 72 horas.

Ao término desse período, as culturas foram ressuspensas, transferidas para tubos cônicos de 15 mL e centrifugadas por 10 minutos a 1000rpm. O sobrenadante foi aspirado e adicionado de 10 mL de solução hipotônica de KCl a 0,075M, em seguida, levadas para estufa à 37°C por 35 minutos. Após este período, foram fixadas em solução de Carnoy por 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, foram centrifugadas a 1000 rpm por 10 minutos, repetindo-se esse processo 2 ou 3 vezes até o sobrenadante ficar límpido.

Para a preparação das lâminas, utilizou-se o método de gotejamento em banho-maria à 60°C e colocadas para secar. Após 12 horas, as lâminas foram coradas com solução de Giemsa a 4%. A análise das lâminas foi realizada em teste cego, utilizando-se objetiva de 40X em microscópio de luz branca. Foram analisadas 1000 células binucleadas para cada tratamento.

As células binucleadas foram selecionadas e contadas com base em critérios como: núcleos com tamanho aproximadamente iguais, intactos, o mesmo padrão de coloração, delimitação do citoplasma visível e sem sobreposição. Os micronúcleos identificados foram conferidos por outro analista experiente ou pelo orientador.

4.3.3. Teste do micronúcleo e anomalias nucleares em eritrócitos de *Astyanax* sp

O presente estudo aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais em Pesquisa da Pontifícia Universidade Católica de Goiás. Protocolada no CEUA sob o nº 6244160316 (Anexo A) e de acordo com os preceitos da Lei 11.794 8 de outubro de 2008 e do Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, conforme as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) do Brasil.

O teste do micronúcleo em peixes é similar ao teste em mamíferos e foi adaptado para as características do organismo-teste, baseado na metodologia descrita por Heddle (1973), modificado por Figueiredo (2012). Para a realização dos testes foram obtidos 100 espécimes sem distinção de sexos de *Astyanax* sp no comércio local da cidade de Goiânia e encaminhados ao Núcleo de Pesquisas Replicon, da Pontifícia Universidade Católica de Goiás para aclimatar por um período de 15 dias conforme mostra a Figura 7.



Figura 7. Aclimação dos exemplares de *Astyanax* sp no Núcleo de Pesquisas Replicon da PUC Goiás. Fonte: Acervo pessoal (2017).

Após a aclimação, os peixes foram separados em 14 aquários, ficando mais 48 horas em observação. Em seguida, além do grupo controle não exposto, os animais foram expostos às concentrações de 20mg/L, 10mg/L e 5mg/L das amostras extrativas de *B. gaudichaudii* e *C. ferrea*, por 96 horas. Posteriormente à exposição, os animais foram eutanasiados por xilocaína a 5%. Previamente à coleta sanguínea, as amostras foram colocadas em tubos tipo cônicos com 1 mL de soro fetal bovino e homogeneizadas em seguida, centrifugadas por 3 minutos a 1000rpm.

As lâminas foram preparadas pelo método de esfregaço e fixadas em etanol absoluto por 15 minutos e colocadas *overnight* para secar. Posteriormente, foram coradas em solução de Giemsa a 4% por 10 minutos.

Para a análise das lâminas, os parâmetros considerados foram as alterações nucleares como: núcleos reniformes, segmentados, lobulados e binucleados, além de células com micronúcleos. Os critérios utilizados para seleção das células foram: células nucleadas sem sobreposição, núcleos intactos e limite citoplasmático definido.

As características dos eritrócitos micronucleados avaliados consistiram na morfologia do micronúcleo, similar ao núcleo principal, possuindo diâmetro entre 1/16 e até 1/3 do núcleo principal; estar separado do núcleo principal; ter o mesmo padrão de coloração e não apresentar refringência. A análise foi realizada sob microscopia de luz branca (AxioImager 2[®] Carl Zeiss – Alemanha) e foram contadas 1000 células para cada grupo analisado.

4.3.4. Ensaio Cometa em *Astyanax* sp

O ensaio cometa foi realizado segundo a técnica descrita por Singh et al. (1988), com modificações para adaptar a técnica para peixes. As amostras biológicas foram coletadas dos mesmos organismos utilizados no teste de micronúcleo, descrito anteriormente.

Para a realização da técnica, lâminas de microscopia foram previamente mergulhadas em agarose a 1,5% mantidas à temperatura ambiente, pelo período de 12 horas para secagem. As amostras de eritrócitos foram suspensas e homogeneizadas em agarose baixo ponto de fusão e espalhadas nas lâminas, as quais foram cobertas com lamínulas e colocadas em refrigerador por 5 minutos. Em seguida, foram retiradas as lamínulas e as lâminas foram mergulhadas em solução de lise e devolvidas ao refrigerador a 4°C por 24 horas.

Posteriormente, as lâminas foram transferidas para uma cuba horizontal de eletroforese contendo tampão de eletroforese em condições alcalinas (pH 13), na qual permaneceram por 25 minutos, para a corrida eletroforética, para desnaturar o DNA.

Após os 25 minutos de corrida eletroforética a 25V e a 300mA, as lâminas foram lavadas com solução neutralizadora de TRIS a 0,4M e pH 7,5 por 3 vezes em intervalo de 5 minutos e secas em temperatura ambiente. Posteriormente, foram fixadas em etanol absoluto por 10 minutos. A coloração das lâminas foi realizada com 10 µL de brometo de etídeo (5g/µL) e coberta por lamínula.

Foram analisados 100 nucleóides por lâminas por tratamentos. Para a captura de imagens utilizou-se microscopia de epifluorescência (AxioImager 2[®] Carl Zeiss – Alemanha)

com objetiva de 10x equipado com filtro de excitação de 515 – 560 nm e um filtro de barreira de 590 nm. As imagens foram capturadas utilizando o *software* ZEN® (Carl Zeiss – Alemanha) e processadas digitalmente. Para as estimativas do nível de dano ao DNA utilizou-se o *software* CometScore™ (versão 1.5). Os parâmetros considerados foram comprimento da cauda do cometa, porcentagem de DNA na cauda do cometa e momento da cauda de *Olive*.

4.4. Análise Estatística

Para a avaliação dos efeitos citotóxicos e genotóxicos, os dados obtidos foram tabulados no programa Excel 2010 e expressados como média e desvio padrão em porcentagem (frequência). Para a análise estatística, a princípio utilizou-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis para comparar as médias do índice mitótico entre os tratamentos e entre o controle. Posteriormente, para análise das frequências de células com alterações nucleares e frequência de micronúcleos. Na análise comparativa utilizou-se o teste de regressão linear simples. A análise final, o teste de Mann-Whitney visando a exclusão de falsos positivos. Todos os testes foram realizados por meio do software BioEstat 5,0, com nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Testes fitoquímicos qualitativos

Os resultados dos testes fitoquímicos realizados nos extratos das cascas de *Brosimum gaudichaudii* e dos frutos de *Caesalpinia ferrea*, visando a verificação da presença de alcalóides, antraquinônicos, cumarinas, flavonóides e taninos em ambas as amostras extrativas, foram considerados válidos, já que foram identificadas praticamente todas essas classes químicas nas duas amostras extrativas.

No presente estudo foi observada a presença de alcalóide na solução extrativa de *C. ferrea*. Porém, não foi verificado a ocorrência deste metabólito na amostra de *B. gaudichaudii*. Conforme mostrado na Figura 8. Adicionalmente, a presença de heterosídeos antraquinônicos foi verificada em ambos os extratos, conforme mostrado na Figuras 9.

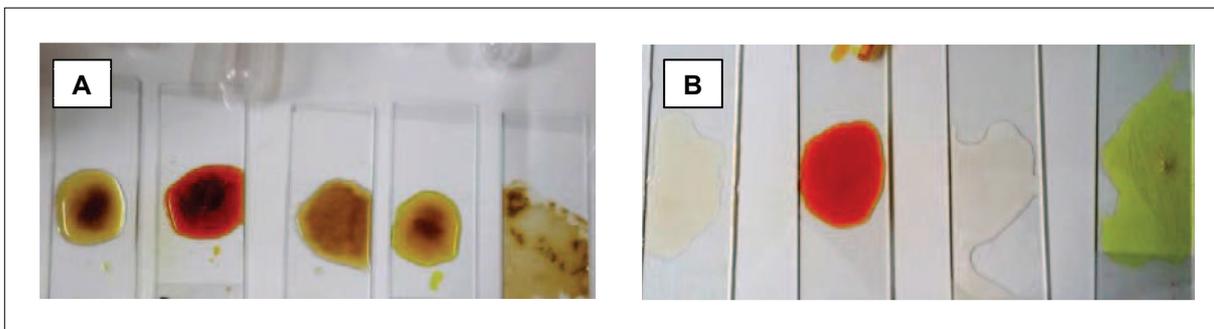


Figura 8. Resultados dos testes para alcalóides. Em [A] extrato dos frutos *C. ferrea* (jucá). Em [B] extratos das Cascas *B. gaudichaudii* (inharé).

Fonte: Acervo pessoal (2017).

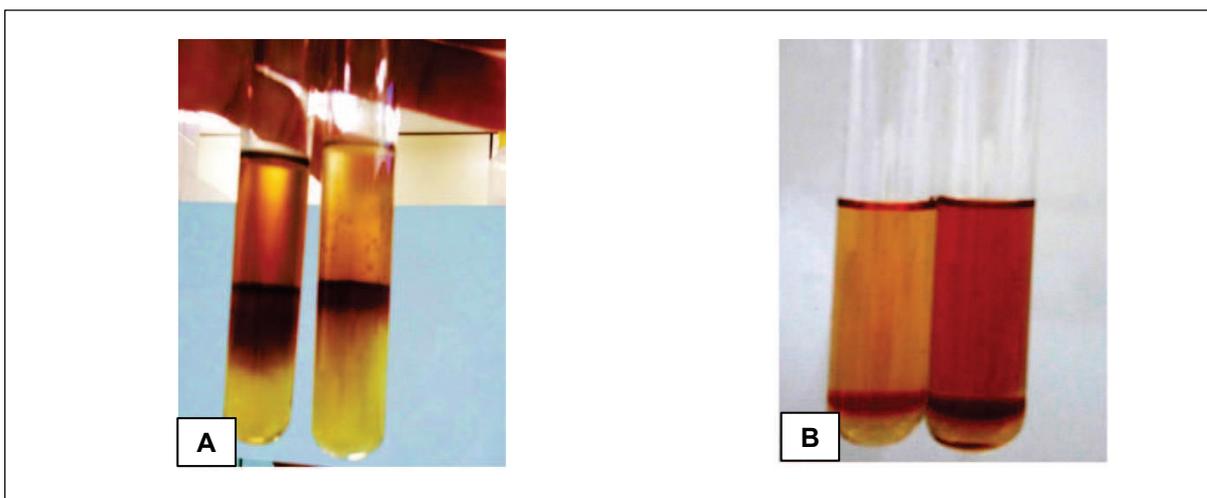


Figura 9. Resultado dos testes para heterosídeos antraquinônicos. Em [A] extrato dos frutos de *C. ferrea*. Em [B] extrato das cascas de *B. gaudichaudii*.

Fonte: Acervo pessoal (2017).

O teste para determinação de cumarinas apresentou-se positivo nas duas soluções extrativas. Também foi verificado a presença de flavonóides, tanto no extrato das cascas de inharé quanto no extrato dos frutos de jucá.

O teste realizado para identificação de taninos também detectou a presença desse metabólito em ambas amostras.

A Tabela 4 mostra de forma resumida os resultados dos testes fitoquímicos dos extratos das cascas e dos frutos das espécies estudadas.

Tabela 4: Resultados observados dos testes fitoquímicos nas amostras extrativas de *B. gaudichaudii* e *C. ferrea*, para a caracterização de alcalóide, antraquinônicos, cumarinas, flavonóides e taninos.

Classes químicas	Compostos reativos	<i>B. gaudichaudii</i> (inharé)	<i>C. ferrea</i> (jucá)
Alcalóides	Mayer	-	+
	Dragendorff	-	+
	Bertrand	-	+
	Hager	-	+
	Ácido tânico	-	+
Antraquinônicos	Amônia	+	+
Cumarinas	Hidróxido de sódio	+	+
Flavonóides	Cianidina	+	+
	Oxalo-bórica	+	+
	Ácido sulfúrico	-	+
	Hidróxido de sódio	+	+
	Cloreto de alumínio	-	+
	Cloreto férrico	+	+
Taninos	Gelatina	-	+
	Sulfato de quinina	-	+
	Acetato de cobre	+	+
	Hidróxido de sódio	-	+
	Cloreto férrico	+	+

Resultados dos testes fitoquímicos realizado nos extratos inharé (*B. gaudichaudii*) e de jucá (*C. ferrea*). A presença das classes químicas estão representadas pelo sinal (+) e a ausência pelo sinal (-) em ambas amostras extrativas.

Os resultados obtidos no presente estudo estão de acordo com relatos prévios da literatura, que reportaram sobre a presença de metabólitos secundários em fitoconstituíntes, validando assim o estudo para essas classes químicas: antraquinônicos, flavonóides e taninos encontrados em extratos de casca de *Brosimum gaudichaudii* (GODINHO et al. 2015). Adicionalmente, foram encontrados alcalóides e cumarinas em extratos dos frutos de *Caesalpinia ferrea* (KOBAYASHI et al. (2015); NAKAMURA et al. 2002), também verificou-se a presença de compostos fenólicos, antocianinas, antocianidinas, flavonóides, leucoantocianidinas, catequinas, flavonas e saponinas no extrato aquoso dos frutos de *C. ferrea* (CAVALCANTE et al. 2015).

Tem sido relatado que os alcalóides possuem atividade analgésica e tranquilizante, quando ministrados em pequenas doses (ROSA et al. 2016). Os antraquinônicos têm função purgativa, pois são estimuladores dos movimentos peristálticos intestinais. Os flavonóides possuem entre as suas atividades biológicas, propriedades antioxidante e antiinflamatória (GODINHO et al. 2015). Os taninos possuem propriedades adstringente e antioxidante, de acordo com relatos da literatura estas propriedades estão relacionadas com cicatrização de feridas (ROSA et al. (2016); KOBAYASHI et al. 2015).

Compostos químicos como psoraleno podem ser encontrados em extrato obtidos a partir de cascas da parte inferior do caule de *B. gaudichaudii*, rico em furocumarinas de ação fotossensibilizante e comumente empregado na produção de medicamentos para tratamento de vitiligo (LEÃO et al. 2005).

Ressalta-se, que produtos naturais derivados de plantas podem conter flavonóides que têm sido associados a diversas propriedades consideradas farmacológicas dentre elas a quimioprolifática de câncer, porém, têm sido associados também a efeitos citotóxicos (TAKEOKA; DAO, 2003).

A ausência de alguma classe de metabólito secundário do extrato de *C. ferrea* e *B. gaudichaudii* observada no presente estudo, pode ser justificada pelas variações climáticas e/ou pelos tipos de solo de onde foi coletado o material botânico. Os fatores ambientais podem influenciar na ausência ou presença de alguns metabólitos secundários encontrados nas plantas (SOUSA, 2011).

5.2. Teste de *Allium cepa*

Os resultados do teste em células meristemáticas apicais de *Allium cepa*, conforme apresentado na Figura 10, expostas às diferentes concentrações dos extratos de *Brosimum*

gaudichaudii (inharé) e *Caesalpinia ferrea* (jucá) foram comparados com os resultados obtidos de raízes não expostas e cultivadas em água do saneamento público da cidade de Goiânia-GO, por um período de exposição de 24 horas.

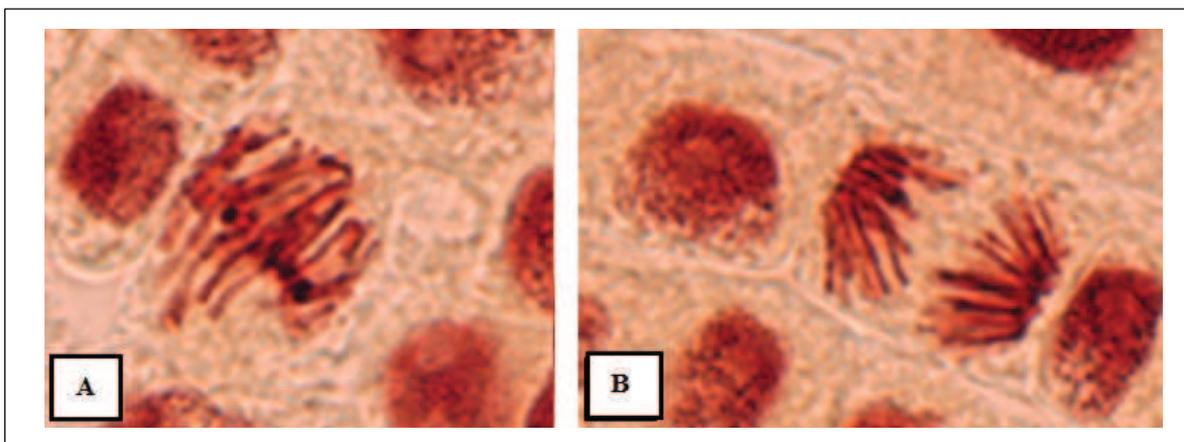


Figura 10. Células meristemáticas de *Allium cepa* expostas às diferentes concentrações dos extratos de *Brosimum gaudichaudii* (inharé) e *Caesalpinia ferrea* (jucá). Em [A] metáfase normal. Em [B] anáfase normal. Fonte: Acervo pessoal (2017).

A análise dos resultados revelou que os extratos não apresentaram potencial mutagênico e/ou citotóxico, segundo as condições testadas. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativa para os parâmetros índice mitótico, frequência de micronúcleos e erros de migração cromossômica (metáfases e anáfases anormais) em células meristemáticas da raiz de *A. cepa* entre os testes e seus controles no presente estudo.

Ao analisar separadamente o índice mitótico em células expostas ao extrato de *Brosimum gaudichaudii* (inharé) verificou-se, sem efeito significativo ($p > 0,05$), porém, foi observado, que conforme o aumento da concentração de *B. gaudichaudii*, maior é a inibição da divisão das células meristemáticas radiculares, sobretudo para a concentração de 5g/L, estatisticamente significativo ($p = 0,038$), quando comparado com o índice mitótico do grupo de raízes não expostas aos extratos vegetais.

Para as concentrações do extrato dos frutos de *Caesalpinia ferrea*, não foram observadas alterações estatisticamente significativas ($p > 0,05$) para os parâmetros avaliados pelo teste *A. cepa*, quando comparadas com o grupo de células oriundas de raízes cultivadas em água da rede de saneamento público ou quando comparadas entre si.

A Figura 11 expressa a média dos índices mitóticos observados, após o tratamento de 24h, pela exposição das raízes dos bulbos de *A. cepa*, nas diferentes concentrações do extrato de *B. gaudichaudii* (inharé), enquanto que a Figura 12 para *C. ferrea* (jucá).

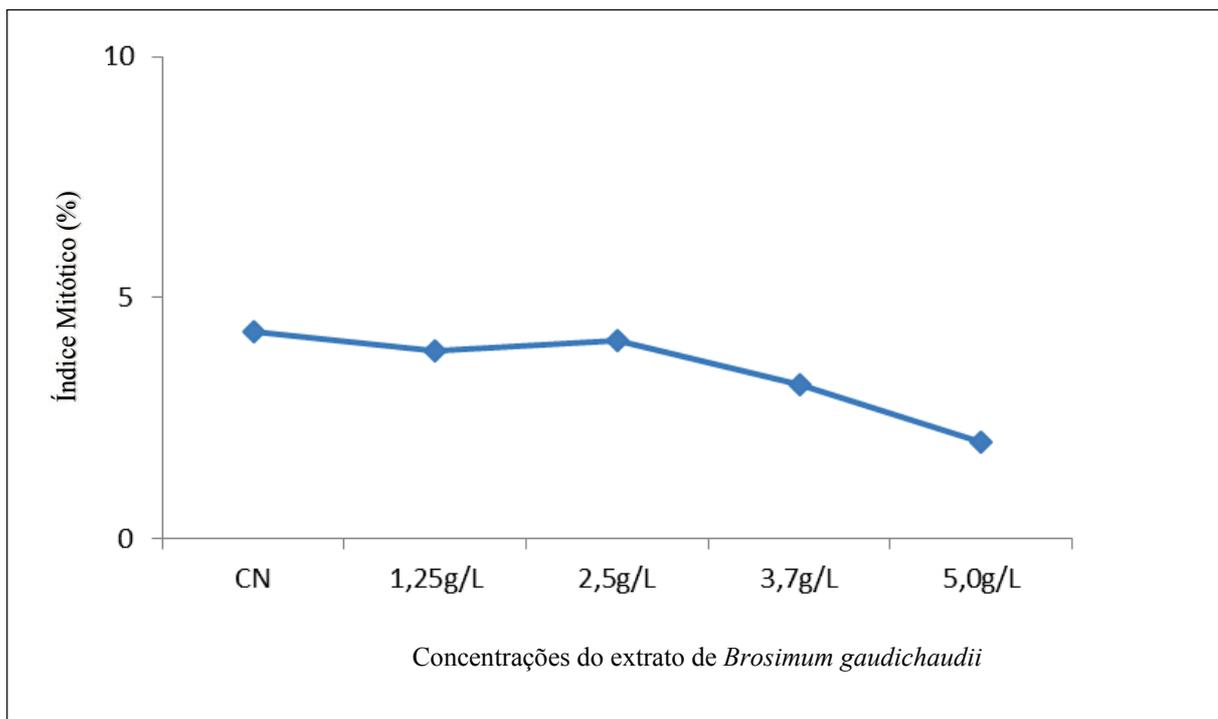


Figura 11. Média dos índices mitóticos observados após o tratamento às diferentes concentrações do extrato etanólico das cascas do *B. gaudichaudii* (inharê).
 Fonte: Acervo pessoal (2017).

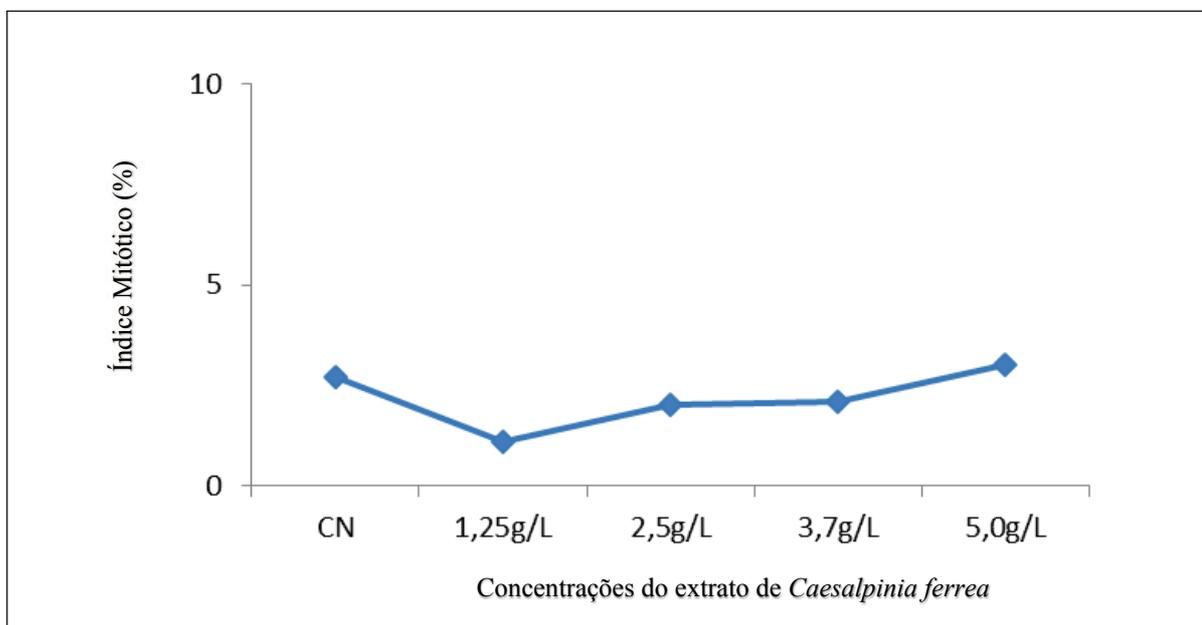


Figura 12. Média dos índices mitóticos observados após o tratamento às diferentes concentrações do extrato etanólico dos frutos do *C. ferrea* (juçá).
 Fonte: Acervo pessoal (2017).

Apesar dos resultados do teste de *Allium cepa* não indicarem mutagenicidade para as concentrações analisadas em ambos extratos, a citotoxicidade observada no estudo

pode ter sido induzida pelos compostos químicos psoraleno e ao bergapteno constituintes do *B. gaudichaudii*. Estudos anteriores relataram que os extratos aquoso e metanólico de *B. gaudichaudii* (inharé) possuem efeitos mutagênicos devido a presença de psoraleno e de bergapteno nesta espécie medicinal (JACOMASSI, 2006).

Neste estudo, as concentrações testadas do extrato etanólico de *Caesalpinia ferrea* não demonstraram potencial citotóxico e/ou mutagênico, porém, ressalta-se que, Silva e colaboradores (2015) analisando o potencial citotóxico, genotóxico e citoprotetor do extrato aquoso de *Caesalpinia pyramidalis* Tul, *Caesalpinia ferrea* Mart. e *Caesalpinia pulcherrima* Sw relataram que o extrato aquoso da vagem de *C. ferrea* (jucá) na concentração de 1g/500mL, administradas em dois tempos de exposição de 24h e 48h, foi citotóxico para as células meristemáticas de *Allium cepa*. Segundo dados da literatura os frutos de *Caesalpinia ferrea* (jucá) possuem potencial protetor frente as células de medula óssea de roedores tratadas com drogas mutagênicas (SOUZA et al. 2006).

Estudos investigativos têm evidenciado o potencial genotóxico de substâncias extraídas de plantas medicinais em organismos como roedores e plantas. O uso destas plantas tem sido vivenciado por várias gerações ao longo da história da humanidade. As plantas representam uma fonte de produtos naturais com princípios ativos que podem resultar em efeitos mutagênicos. O estudo toxigenético na análise de fitoconstituíntes é imprescindível para avaliação do seu potencial tóxico. Entre os testes de avaliação toxicológica destaca-se o teste de *Allium cepa* (LUZ et al. 2012).

O sistema teste de *Allium cepa* tem sido considerado importante para detecção de genotoxicidade de fitoconstituíntes sendo solicitado para o estudo de efeitos de citotoxicidade de plantas medicinais. Atualmente, é comum relatos de vários autores a respeito dos efeitos dos chás e/ou infusões de plantas com valor medicinal sobre o ciclo celular de *Allium cepa*. O teste de *Allium cepa* também tem sido utilizado para promover o monitoramento da qualidade ambiental, bem como na avaliação do potencial mutagênico de plantas. O sistema teste de *Allium cepa* é fundamentado na avaliação de toxicidade, citotoxicidade e mutagenicidade de agentes químicos presentes no ambiente como solo, efluentes de rios e amostras residuais (BAGATINE et al. 2007).

Portando, o teste em células meristemáticas radiculares de *Allium cepa*, além de ser um bom indicador para triagem de citotoxicidade, permite obter uma resposta precisa sobre o dano que um fitoconstituínte pode ocasionar na saúde da humanidade.

5.3. Teste do micronúcleo em linfócitos T humanos

As Figuras 13 e 14 ilustram os resultados referentes ao teste do micronúcleo para as concentrações 0,039g/L, 0,078g/L e 0,156g/L de *B. gaudichaudii* (inharé) e *C. ferrea* (jucá), respectivamente, em linfócitos T humanos binucleados.

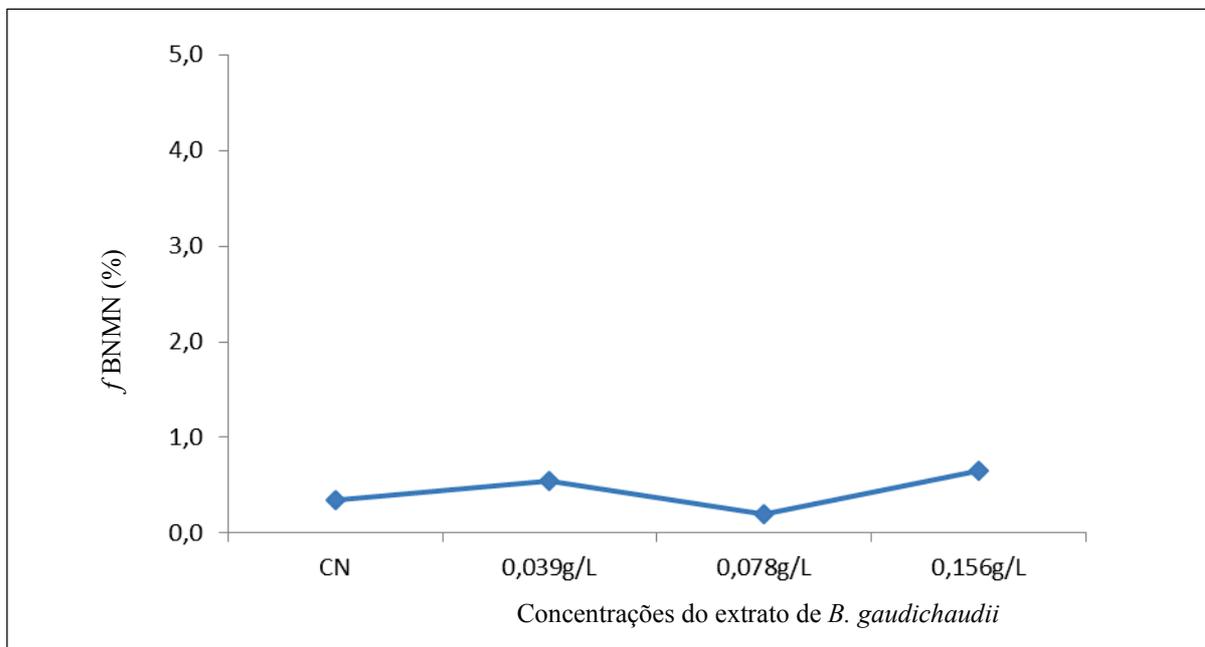


Figura 13. Frequências de células binucleadas com micronúcleos observadas após o tratamento às diferentes concentrações do extrato etanólico das cascas de *Brosimum gaudichaudii* (inharé).

Fonte: Acervo pessoal (2017).

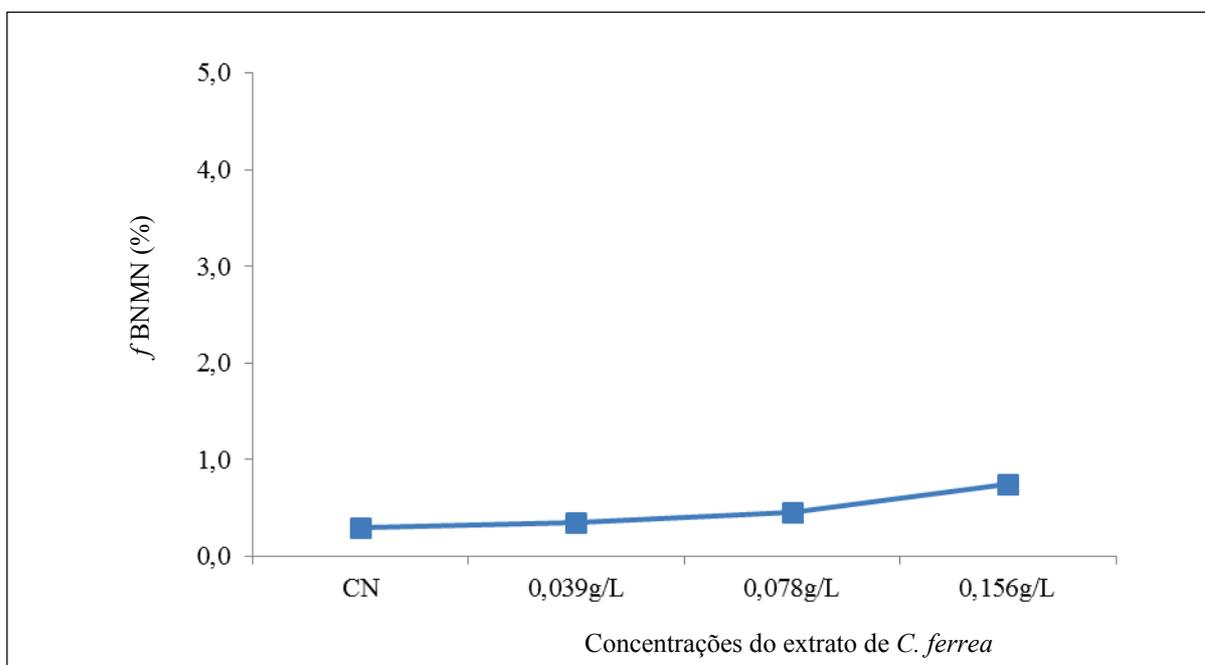


Figura 14. Frequências de células binucleadas com micronúcleos observadas após o tratamento às diferentes concentrações do extratos etanólicos dos frutos de *Caesalpinia ferrea* (jucá).

Fonte: Acervo pessoal (2017).

O teste de micronúcleo realizado em linfócitos T humanos binucleados, expostos aos extratos das cascas de *B. gaudichaudii* e dos frutos de *C. ferrea*, não evidenciou efeitos mutagênicos. As médias das frequências observadas de células binucleadas com micronúcleos não foram estatisticamente diferentes ($p=0,697$ e $p=0,512$, para ambos extratos respectivamente) quando comparadas com as médias das frequências observadas no grupo células não expostas aos extratos vegetais.

Ressalta-se, que apesar dos resultados do teste do micronúcleo em linfócitos T humanos não terem revelado diferenças significativas nas concentrações avaliadas em ambos extratos e apesar do estudo não comprovar atividade mutagênica em *Brosimum gaudichaudii* e *Caesalpinia ferrea*, existem relatos na literatura sobre efeitos mutagênicos dos extratos aquoso e metanólico de *B. gaudichaudii* devido a toxicidade das furanocumarinas presentes nas cascas de inharé (LOURENÇO, 2001). Estudos preliminares nos frutos de jucá demonstraram citotoxicidade nas células meristemáticas de *Allium cepa* (SILVA et al. 2015). Porém, o extrato aquoso de *C. ferrea* demonstrou-se eficaz no estímulo da mielopoiese frente à listeriose promovendo proteção contra dose letal de *Listeria monocytogenes* (FREITAS, 2012).

Existem poucas informações disponíveis na literatura sobre o teste do micronúcleo em linfócitos T humanos para avaliar atividade mutagênica de infusos, extratos e decoctos de plantas medicinais. Por outro lado, corroborando com este estudo, Figueiredo (2012) também não evidenciou danos induzidos pela exposição em decocto de *Cochlospermum regium* (Mart. et Schr) Pilger (Bixaceae).

Conforme Figueiredo (2012) o teste do micronúcleo em linfócitos T possuem vantagens pois trata-se de células humanas, de fácil obtenção e evitam a eutanásia de animais utilizados em outros ensaios mutagênicos. Portanto, o teste do micronúcleo realizado em linfócitos T é um ensaio imprescindível na avaliação da mutagenicidade.

5. 4. Teste do micronúcleo e anomalias nucleares em eritrócitos de *Astyanax* sp

Os resultados da avaliação do potencial mutagênico e citotóxico utilizando o teste do micronúcleo e as alterações nucleares em eritrócitos de *Astyanax* sp estão apresentados na Figura 15, a qual evidencia as células sanguíneas de *Astyanax* sp expostos ao extrato dos frutos de *Caesalpinia ferrea* (jucá) e ao extrato das cascas de *Brosimum gaudichaudii* (inharé) nas concentrações de 5mg/L, 10mg/L e 20mg/L, por um período de 96 horas.

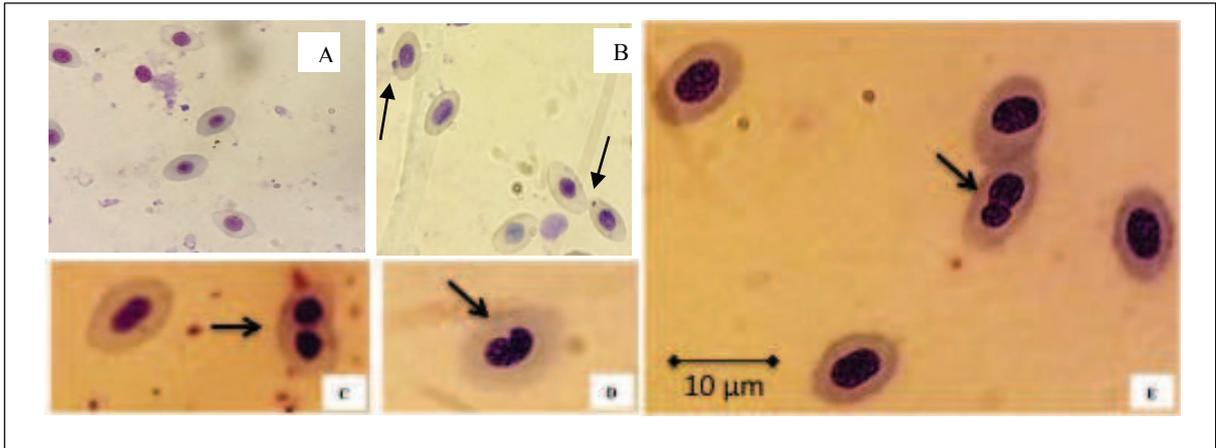


Figura 15. Células sanguíneas de *Astyanax* sp expostos ao extrato dos frutos de *Caesalpinia ferrea* (jucá) e extrato das cascas de *Brosimum gaudichaudii* (inharé). Em [A] eritrócitos normais. Em [B] eritrócitos com micronúcleos (setas). Em [C] eritrócito binucleado. Em [D] eritrócito com anomalia nuclear tipo riniforme (seta). Em [E] eritrócito com anomalia nuclear tipo segmentado.
Fonte: Acervo pessoal (2017).

As médias das frequências de micronúcleos observadas em eritrócitos de *Astyanax* sp expostos às diferentes concentrações do extrato de *Brosimum gaudichaudii* (inharé) e do *Caesalpinia ferrea* (jucá) estão apresentados nas Figuras 16 e 17, respectivamente, sendo que não foram estatisticamente diferentes ($p=0,247$ e $p=0,773$, respectivamente) das médias das frequências observadas nos animais não expostos.

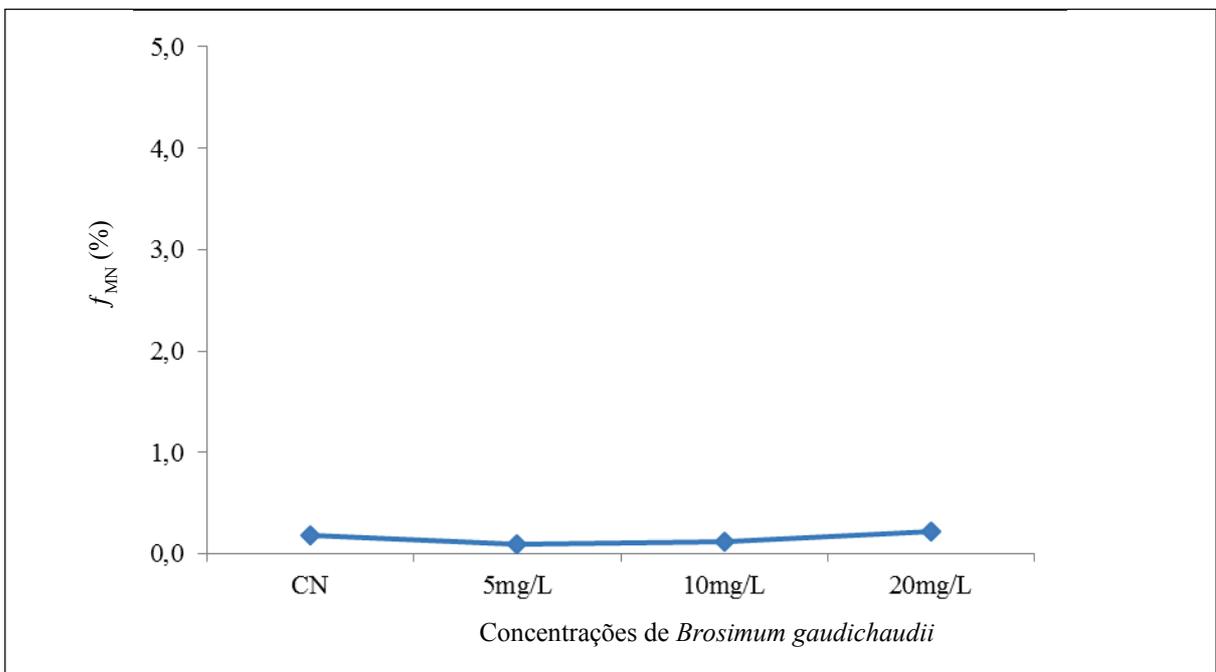


Figura 16. Médias das frequências de micronúcleos observadas em eritrócitos de *Astyanax* sp após a exposição às diferentes concentrações do extrato das cascas de *Brosimum gaudichaudii* (inharé).
Fonte: Acervo pessoal (2017).

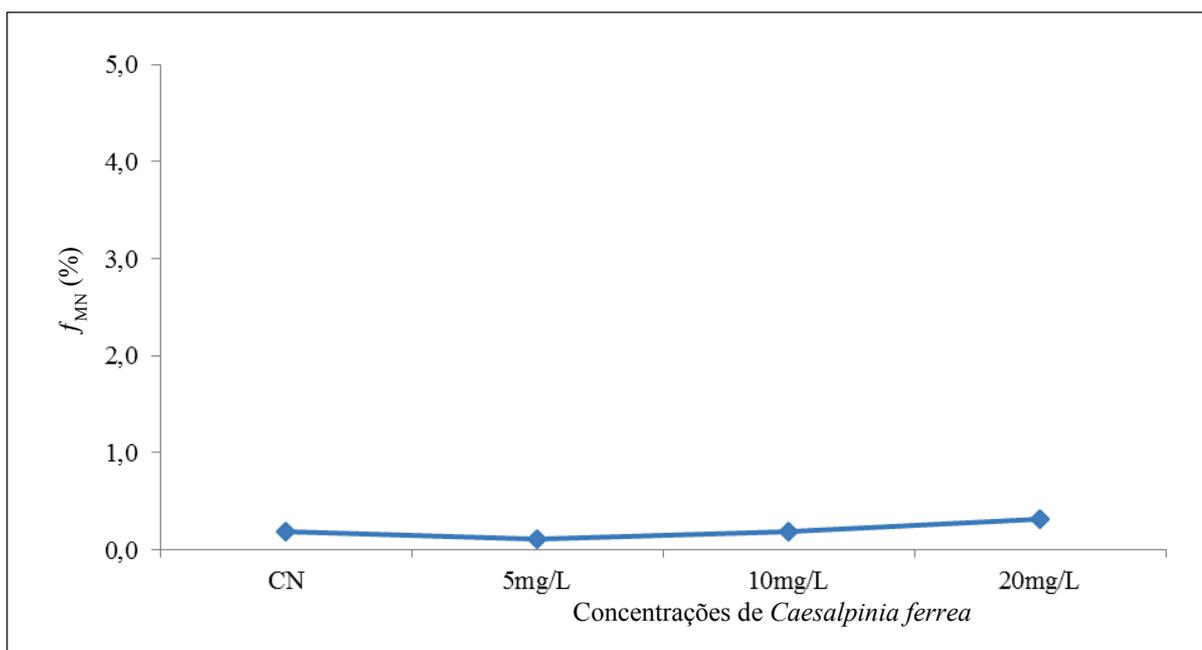


Figura 17. Médias das frequências de micronúcleos observadas em eritrócitos de *Astyanax* sp após a exposição às diferentes concentrações do extrato dos frutos de *Caesalpinia ferrea* (jucá).
Fonte: Acervo pessoal (2017).

Conforme observações de Jacomassi (2006), Cumarinas, presentes nas cascas de *B. gaudichaudii* (inharé) podem promover danos mutagênicos. Adicionalmente, a citotoxicidade do extrato aquoso das vagens de *C. ferrea* (jucá) foi comprovada em células meristemáticas radiculares de *Allium cepa* por Silva e colaboradores (2015).

Segundo figueiredo (2012), compostos químicos constituintes de *C. regium*, entre eles os flavonóides e taninos, que também estão presentes em soluções extrativas de *B. gaudichaudii* e *C. ferrea* foram identificados como carcinogênicos e mutagênicos, ressaltando ainda que a participação efetiva desses composto fenólicos (flavonóides e taninos) na indução de mutação.

O teste do micronúcleo em peixes tem sido um dos ensaios preferenciais para avaliar o dano genético nos organismos, por ser capaz de detectar a ação de agentes genotóxicos que lesionam o material genético. As alterações mutagênicas provindas da quebra de cromossomos ou de aneuploidias levam a formação de micronúcleos nas células dos indivíduos expostos. Portanto, o teste do micronúcleo detecta lesões cromossômica e disfunções no fuso mitótico, além de ser uma ferramenta simples e precisa para a estimativa de efeitos mutagênicos de compostos químicos (RIBEIRO et al. 2003).

Atualmente, é comum aplicabilidade do teste do micronúcleo em peixes para avaliação de mutagenicidade de fitoconstituintes. Os peixes são considerados bons indicadores para a

detecção de contaminação e de efeitos genotóxicos de poluentes dos recursos hídricos por composto químicos, pois possuem características fundamentais para o estudo da toxicologia aquática (BÜCKER, 2006). Segundo dados da literatura, estudos têm demonstrados que diferentes espécies de peixes possuem sensibilidade quando expostos aos compostos genotóxicos e/ou quando presentes em ambientes antropizados, apresentando uma frequência aumentada de micronúcleos em seus eritrócitos (MARTINS; PAZ; BRENTANO, 2010).

Para avaliar danos genéticos, o teste do micronúcleo em eritrócitos de peixes, têm se mostrado confiável, sensível e de fácil aplicação. Os peixes são bioconcentradores e são capazes de responder ao agente mutagênico em concentrações relativamente baixas, essas características tornam os peixes importantes organismos bioindicadores de qualidade ambiental, pois respondem aos efeitos adversos de xenobiontes de forma precisa (SILVA, NEPOMUCENO, 2010).

Na avaliação das alterações nucleares em eritrócitos (AENs) foram analisadas 18000 células, sendo que para cada uma das concentrações dos extratos vegetais, foram avaliadas 6000 eritrócitos, inclusive para o grupo de animais não expostos (controle negativo), totalizando 42000 células analisadas. As médias das frequências das AENs estão expressas nas Figuras 18 e 19, expressando as médias das frequências de eritrócitos com micronúcleos, eritrócitos binucleados, reniformes, segmentados e lobulados, observados em *Astyanax* sp, de acordo com as diferentes concentrações dos extratos padronizados de *B. gaudichaudii* (inharé) e *C. ferrea* (jucá), respectivamente.

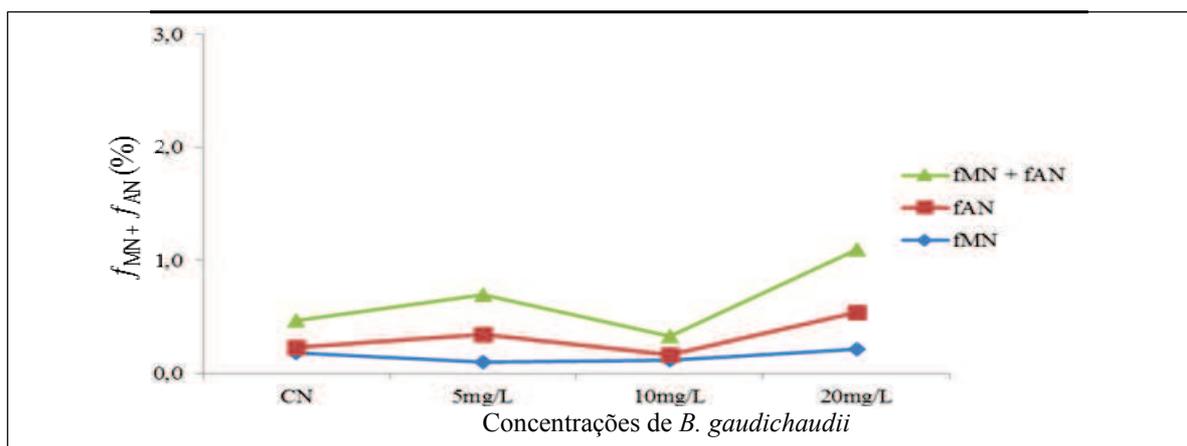


Figura 18. Resultados e médias das frequências de células com micronúcleos e alterações nucleares em eritrócitos de *Astyanax* sp observadas após a exposição às diferentes concentrações do extrato das cascas de *Brosimum gaudichaudii* (inharé).

Fonte: Acervo pessoal (2017).

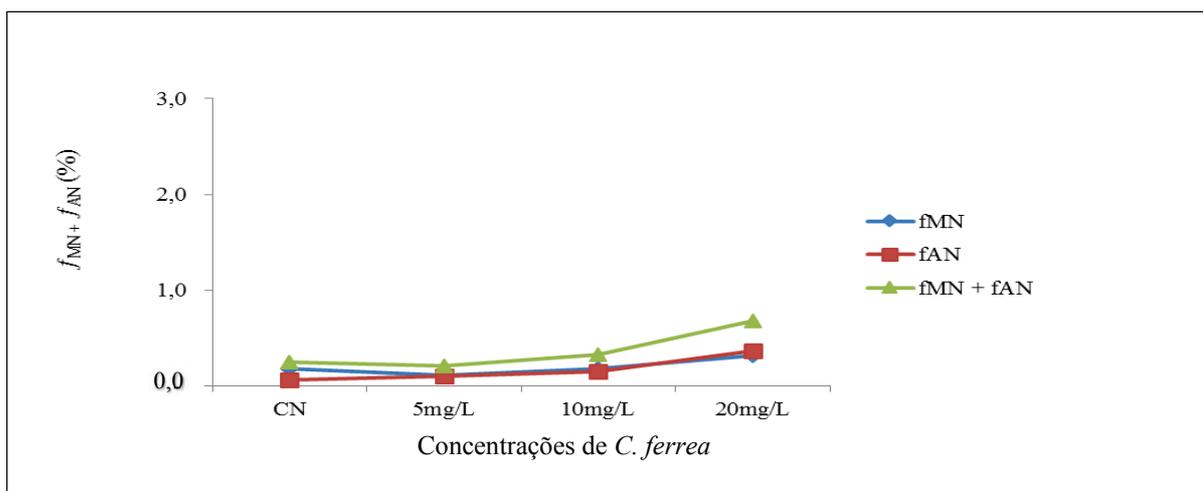


Figura 19. Resultados e médias das frequências de células com micronúcleos e alterações nucleares em eritrócitos de *Astyanax* sp observadas após a exposição às diferentes concentrações do extrato dos frutos de *Caesalpinia ferrea* (jucá).
Fonte: Acervo pessoal (2017).

Neste estudo, não foi observada diferença entre as médias das alterações nucleares para os tratamentos de 5mg/L, 10mg/L e 20 mg/L, em relação seu controle ou quando comparadas entre si para ambos os extratos. No entanto, quando comparado as médias de micronúcleos somado com as médias das outras alterações nucleares, na concentração de 20mg/L de ambos extratos vegetais foi observada diferença significativa ($p \leq 0,05$) quando comparadas com as médias dos controles negativos. A análise de regressão linear simples também mostrou diferença significativa para a mesma concentração (20mg/L) de ambos extratos ($p=0,049$), mas, não apontou diferença estatística para as demais concentrações.

Dessa forma, quanto maior a concentração dos extratos de *B. gaudichaudii* (inharé) e *C. ferrea* (jucá) administradas, maior foi o aumento nas médias das alterações nucleares totais observadas em eritrócitos da espécie *Astyanax* sp.

O aumento nas alterações nucleares totais pode estar associado com a presença dos metabólitos secundários presentes nas plantas medicinais e que em concentrações maiores destes extratos podem induzir mutagenicidade nas células expostas. De acordo com a literatura, é necessário que haja estudos tecnológicos, químicos e biológicos em fitoconstituintes afim de reduzir efeitos adversos destes produtos à saúde humana (SÓLON, 2009).

5.5. Ensaio Cometa em *Astyanax* sp

A porcentagem de DNA na cauda do cometa, o comprimento da cauda do cometa e o momento da cauda de *Olive* foram os parâmetros considerados na análise do potencial genotóxico utilizando o ensaio cometa, conforme descrito na literatura (OLIVEIRA, 2014).

A Figura 20 apresenta a imagem de núcleos de células sanguíneas de *Astyanax* sp expostos às diferentes concentrações dos extratos padronizados de *B. gaudichaudii* (inharé) e *C. ferrea* (jucá), exibindo danos genotóxicos observados no Ensaio cometa.

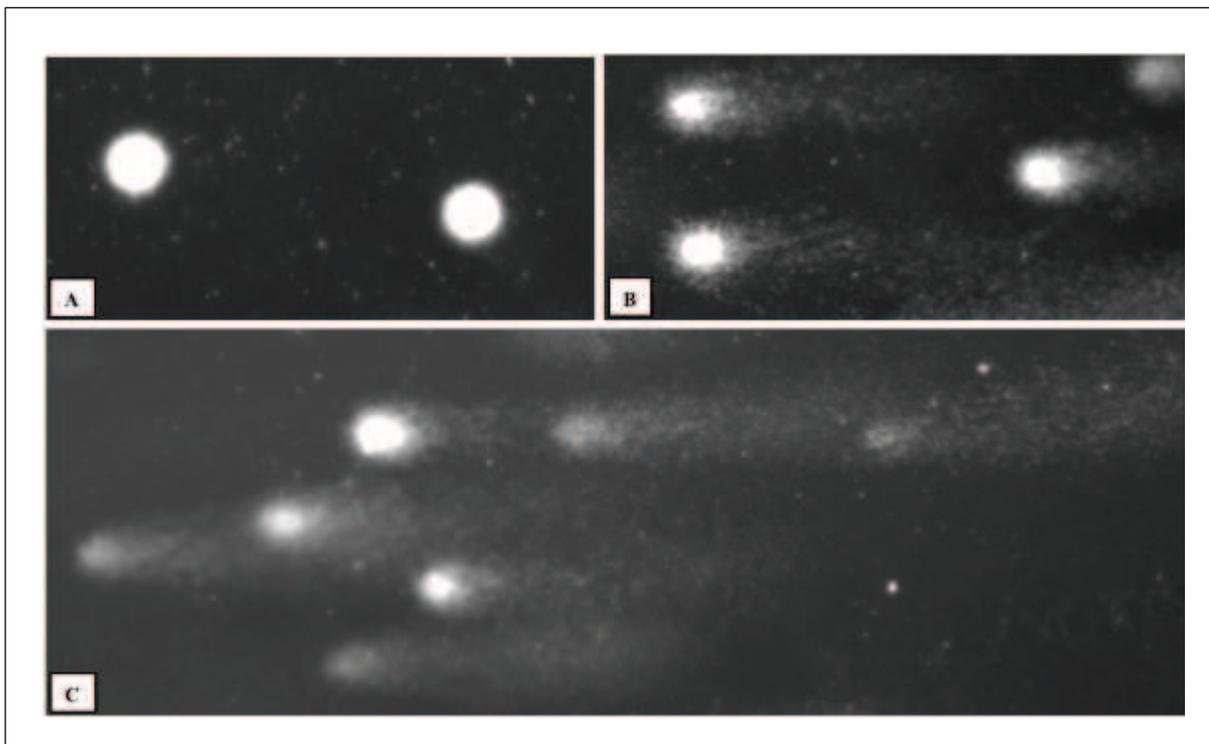


Figura 20. Núcleos de células sanguíneas de *Astyanax* sp expostos às diferentes concentrações de *B. gaudichaudii* (inharé) e *C. ferrea* (jucá). Em [A] núcleo sem danos genômicos. Em [B] núcleo exibindo danos genômicos moderados. Em [C] diversos núcleos exibindo danos genômicos intensos. Fonte: Acervo pessoal (2017).

Na avaliação da genotoxicidade, para cada concentração (5mg/L, 10mg/L e 20 mg/L), 3 peixes (*Astyanax* sp), em duplicata, totalizando 36 animais expostos às diferentes concentrações de ambas soluções extrativas vegetais, separadamente. Os resultados obtidos a partir das amostras de sangue extraídas dos animais expostos foram comparados com os resultados oriundos de 3 animais, em duplicata, não expostos (controle negativo).

Os resultados obtidos na avaliação da genotoxicidade de peixes expostos aos extratos padronizados de *B. gaudichaudii* (inharé) estão apresentados na Tabela 5, e indicam o comprimento da cauda, a porcentagem de DNA na cauda do cometa e o momento da cauda de *Olive*.

Tabela 5. Médias e desvios padrões dos parâmetros analisados pelo ensaio cometa para avaliação da genotoxicidade em sangue *Astyanax* sp expostos às diferentes concentrações de *B. gaudichaudii* (inharé).

Grupos analisados	Comprimento da cauda	Porcentagem de DNA na cauda	Momento da cauda de <i>Olive</i>
Controle Negativo	3,17 ± 0,49	6,18 ± 1,38	0,33 ± 0,15
5 mg/L	2,65 ± 0,62	5,22 ± 2,53	0,51 ± 0,11
10 mg/L	2,01 ± 0,13	5,51 ± 0,41	0,41 ± 0,07
20 mg/L	5,13 ± 1,79	6,98 ± 0,46	0,57 ± 0,12

Teste ANOVA – um critério; Análise de variância: Kruskal-Wallis –comparações pelo método de Dunn.
Fonte: Acervo pessoal (2017).

A Tabela 06 ilustra os resultados da genotoxicidade observada para os parâmetros comprimento de cauda do cometa (para todas as concentrações avaliadas) e momento da cauda de *Olive* (apenas para a concentração de 20mg/L) em amostras de sangue obtidas a partir de animais expostos ao extrato de *C. ferrea* (jucá), evidenciando diferenças significativas ($p \leq 0,05$) quando comparados com os resultados observados no sangue de animais não expostos (controle negativo).

Tabela 6. Médias e desvios padrões dos parâmetros analisados pelo ensaio cometa para avaliação da genotoxicidade em sangue *Astyanax* sp expostos às diferentes concentrações de *C. ferrea* (jucá).

Grupos analisados	Comprimento da cauda	Porcentagem de DNA na cauda	Momento da cauda de <i>Olive</i>
Controle Negativo	3,17 ± 0,49	6,18 ± 1,38	0,33 ± 0,15
5 mg/L	8,00 ± 2,69 [#]	5,96 ± 1,07	0,30 ± 0,32
10 mg/L	8,12 ± 3,19 [#]	7,53 ± 4,45	0,26 ± 0,85
20 mg/L	7,48 ± 1,36 [#]	7,96 ± 1,64	0,86 ± 0,18 [#]

Teste ANOVA – um critério; Análise de variância: Kruskal-Wallis –comparações pelo método de Dunn.
Diferença significativa ($p \leq 0,05$) quando comparados com o controle negativo.
Fonte: Acervo pessoal (2017).

O ensaio cometa tem sido amplamente usado para se avaliar os danos genômicos induzidos pela exposição às substâncias potencialmente genotóxicas. Trata-se de um teste sensível e rápido, constituindo uma excelente ferramenta para os estudos de genética toxicológica, medicina diagnóstica e terapêutica, biomonitoramento da exposição ambiental e também como um dentre os diversos testes realizados nas indústrias farmacêuticas para investigar novas drogas. O ensaio cometa permite detectar se uma substância causa quebras nas fitas simples e/ou duplas de DNA, crosslinks, analisar o sistema de reparo em lesões álcali-lábeis (BÜCKER, 2006; OLIVEIRA, 2012).

A Figura 21 destaca os resultados da exposição dos animais às diferentes concentrações do extrato de *C. ferrea* (jucá), evidenciando o parâmetro comprimento da cauda do cometa.

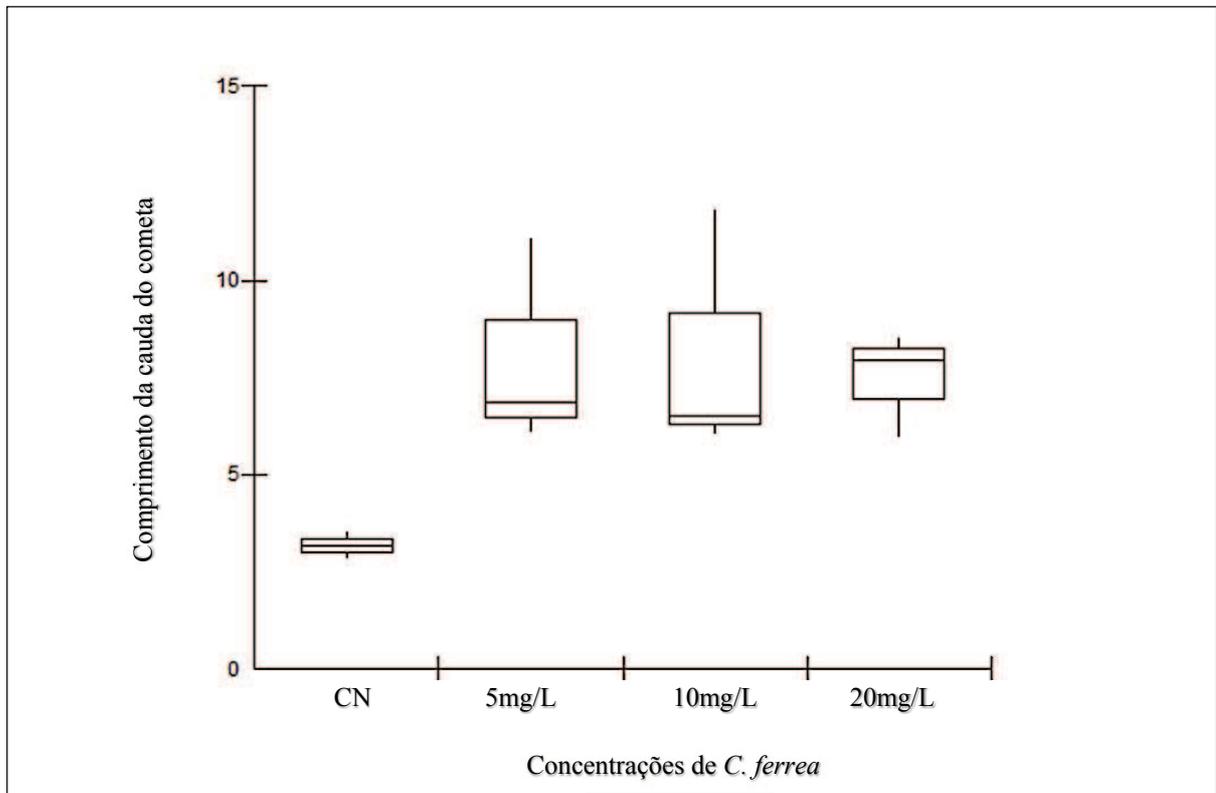


Figura 21. Resultado do Ensaio Cometa para o parâmetro comprimento da cauda do cometa em células do sangue de *Astyanax* sp expostos *in vivo* às diferentes concentrações de *C. ferrea* (jucá).
Fonte: Acervo pessoal (2017).

A Figura 22 destaca os resultados da exposição dos animais às diferentes concentrações do extrato de *C. ferrea* (jucá), evidenciando o parâmetro momento da cauda de *Olive*. Para esse parâmetro houve diferença estatística apenas para a concentração de 20mg/L ($p \leq 0,05$).

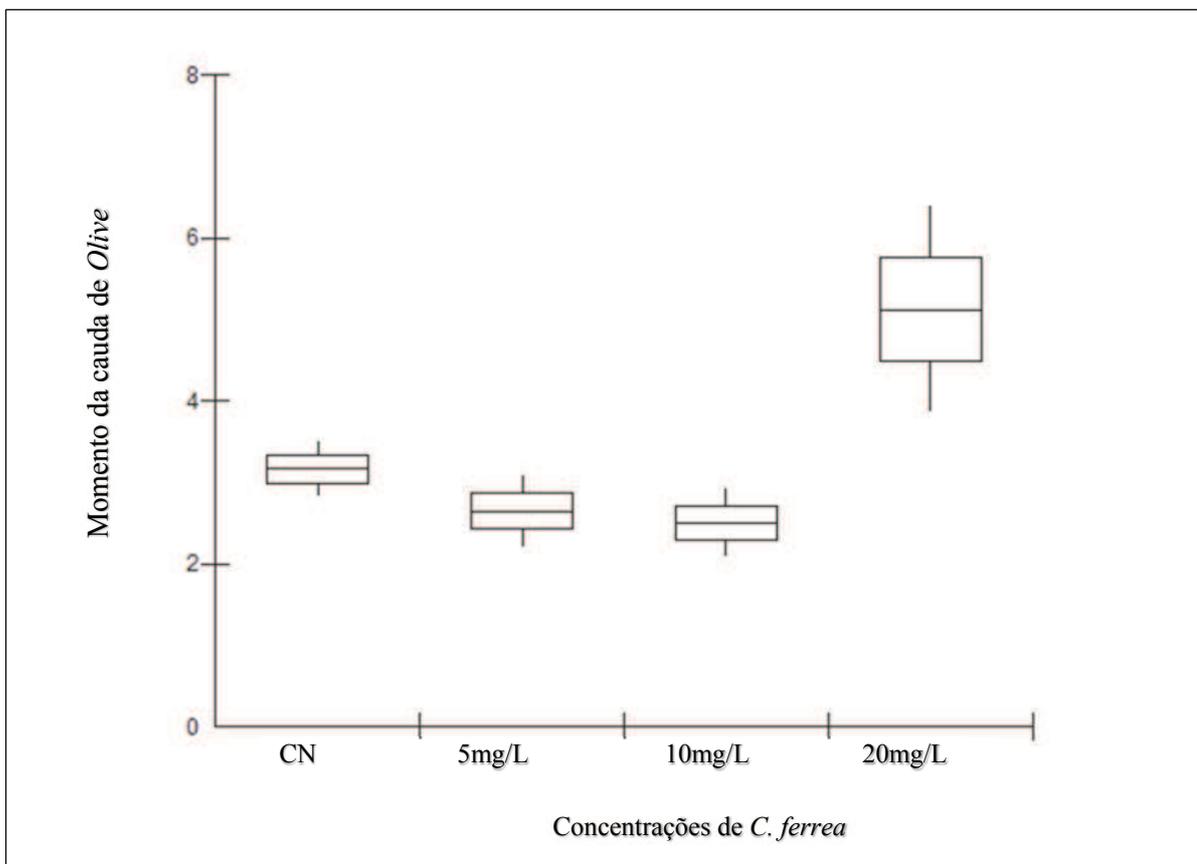


Figura 22. Resultado do Ensaio Cometa para o parâmetro momento da cauda de *Olive* em células do sangue de *Astyanax* sp expostos *in vivo* às diferentes concentrações do extrato de *C. ferrea* (jucá).
 Fonte: Acervo pessoal (2017).

Diferentes parâmetros de análise do ensaio cometa podem ser utilizados para se avaliar o dano no DNA. Neste estudo foram utilizados os parâmetros comprimento de cauda, porcentagem de DNA na cauda e momento da cauda de *Olive*. O comprimento da cauda é um dos parâmetros que indicam que determinada substância em análise induziu danos ao DNA, visto que há migração dos fragmentos do DNA lesionado, os quais se apresentam dispersos ao longo da cauda formada, evidenciando assim, um aspecto de cometa à célula (REIS, 2014; SCALON et al, 2010).

Apesar das concentrações do extrato de *B. gaudichaudii* não terem induzido atividades genotóxicas evidenciadas pelo ensaio cometa nos eritrócitos de *Astyanax* sp, vale ressaltar que em período prolongado de exposição aos agentes com potencial genotóxicos, os danos no DNA podem ter sido reparados. Os danos causados ao DNA são utilizados como biomarcadores para estudos de efeitos de agentes com potencial tóxico (REIS, 2014). Os biomarcadores de genotoxicidade em peixes têm sido amplamente utilizados e são

considerados com parâmetros valiosos para determinação do risco ambiental (SCALON et al, 2010).

Conforme Bückner et al. (2006); Monteiro e colaboradores (2011), o ensaio cometa tem sido amplamente utilizado no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos e como ferramenta para avaliar a indução de danos e reparo no DNA causados por substâncias químicas provindas de fitoconstituíntes, ambientes industriais, domésticos, áreas agricultáveis. Por ser uma técnica simples, sensível, rápida, pode ser usada em tecidos de qualquer eucarioto.

Segundo Scherer e colaboradores (2013), o ensaio cometa é uma importante ferramenta na detecção de genotoxicidade devido a capacidade de identificar lesões pré-mutagênicas. Este ensaio tem sido utilizado com frequência na genética toxicológica, ecotoxicológica, medicina ocupacional, dosimetria biológica entre outras aplicações (LEITE, ZANDONATO, FLUMINHAM, 2013).

De acordo com Oliveira (2012), extratos vegetais podem induz à apoptose de células HeLa com subsequente acumulação de fragmentos de DNA de 180 a 200 pb (pares de base). A clivagem de ICAD (*Inibidor da Desoxirribonuclease Ativada por Caspase*) em CAD (*Desoxirribonuclease Ativada por Caspase*) leva à fragmentação do DNA (evento tardio da apoptose).

Logo, a genotoxicidade observada pelo ensaio cometa em células sanguíneas de peixes *Astyanax* sp expostos às diferentes concentrações do extrato de *C. ferrea* (jucá) se deva a ativação das caspases. Consequentemente, a ativação das caspases leva à fragmentação do DNA, expressa no aumento das médias do comprimento de cauda dos cometas, quando comparado ao controle negativo.

O uso de plantas medicinais têm contribuído para a saúde humana e animal em escala mundial, o que justifica a frequência de estudos para avaliar a sua segurança e eficácia de fitoconstituíntes. Os testes sensíveis à curto prazo que detectam danos genéticos como *Allium cepa*, teste do micronúcleo, ensaio cometa e o ensaio de Ames, têm fornecido informações importantes para avaliação de toxicidade e mutagenicidade (WYREPKOWSKI, 2014).

Neste estudo o ensaio cometa detectou danos genotóxicos nos eritrócitos dos animais tratados com as diferentes concentrações dos extratos de *C. ferrea* (jucá), pelo parâmetro comprimento da cauda do cometa e momento da cauda de *Olive* (apenas para a concentração de 20mg/L). Diversos relatos na literatura demonstraram a genotoxicidade dos compostos psoraleno e bergapteno, ambos presentes em *B. gaudichaudii*. Embora exista a possibilidade

de toxicidade desses dois compostos, ambos são fundamentais para produção do Viticromin[®], medicamento muito utilizado para o tratamento do vitiligo (LEÃO et al. 2005).

A concordância parcial dos resultados aqui apresentados não foram relacionados devido a presença de variáveis observadas, desde a diferenças entre as concentrações administradas, período de exposição, diferenças entre os organismos-teste e sensibilidade dos ensaios utilizados.

6. CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos neste estudo conclui-se que:

- Foi possível a obtenção dos extratos etanólicos padronizados de *Caesalpinia ferrea* e *Brosimum gaudichaudii*, os quais apresentaram em prospecção fitoquímica qualitativa, a identificação de metabólitos secundários, semelhantes aos relatos publicados na literatura.
- O potencial citotóxico e/ou mutagênico dos extratos vegetais por meio da análise do índice mitóticos e alterações na migração cromossômica não foram observados em células meristemáticas radiculares apicais de *Allium cepa*, nas condições testadas para as concentrações de 1,25g/L, 2,5g/L, 3,7g/L e 5g/L, de *C. ferrea* e *B. gaudichaudii*, no entanto, a concentração 5g/L de extrato de *B. gaudichaudii*, foi significativa. O aumento da concentração de extrato de *B. gaudichaudii* (inharé) inibem a proliferação celular, demonstrando a relação concentração-dependente e a susceptibilidade para atividades genotóxicas.
- As diferentes concentrações dos extratos de *B. gaudichaudii* e *C. ferrea* avaliados não induziram erros de migrações cromossômicas em células meristemáticas do ápice radicular de *Allium cepa*.
- O teste do micronúcleo em linfócitos T humanos não identificou atividade mutagênica para as diferentes concentrações avaliadas dos extratos de *B. gaudichaudii* e *C. ferrea*.
- O teste do micronúcleo em eritrócitos de *Astyanax* sp não identificou potencial genotóxico nas diferentes concentrações de ambos extratos avaliados. Em relação as alterações nucleares nos eritrócitos de animais expostos, não foi identificada ação citotóxica que pudesse ser revelada pelo ensaio.
- No entanto, quando se considera as médias das alterações nucleares totais (eritrócitos com micronúcleos e as outras alterações nucleares, para a concentração de 20mg/L do extrato *B. gaudichaudii*) verificou-se que foram maiores que as médias das alterações nucleares totais observadas em eritrócitos da espécie *Astyanax* sp não expostos, evidenciando ação mutagênica e citotóxica para doses elevadas.

- O ensaio cometa identificou potencial genotóxico do extrato *C. ferrea* em eritrócitos de *Astyanax* sp nas concentrações avaliadas, considerando o parâmetro comprimento da cauda do cometa e momento da cauda de *Olive* (apenas para a concentração de 20mg/L). Neste estudo o ensaio cometa não detectou danos genotóxicos nos eritrócitos dos animais tratados com as diferentes concentrações dos extratos de *B. gaudichaudii* (inharé).
- Portanto, é necessário ampliar os estudos para um melhor entendimento sobre atividades genotóxicas e mutagênicas de plantas medicinais em especial *Brosimum gaudichaudii* e *Caesalpinia ferrea* sobre a saúde animal e humana. A realização de metodologias voltadas à investigação toxicológica de compostos químicos dessas plantas é de caráter essencial para o estabelecimento de doses seguras de consumo.
- Nesse sentido, espera-se que o presente estudo possa contribuir para reforçar a necessidade de políticas que visem pesquisas no âmbito científico que elucidem de forma precisa sobre as atividades genotóxicas e mutagênicas em fitoconstituintes.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS A. K.; LICHTMAM. **Imunologia Celular e Molecular**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

ABILHOA, V. **Composição, aspectos biológicos e conservação da ictiofauna do alto curso do rio Iguaçu, região metropolitana de Curitiba, Paraná, Brasil**. 2004. 84f. Tese (Doutorado em Zoologia) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.

ABREU, C. R. A. **Qualidade e atividade antioxidante total de pedúnculos de clones comerciais de cajueiro anão precoce**. 2007. 111f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2007.

ABREU, R. L. File: Maranhão Munic. Cidelândia. Svg. Disponível no site: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Maranhao_Municip_Cidelandia.svg. Acessado 16 de març. 2017

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA, 2010). **Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº48**. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol>. Acessado em 18 abril, 2016.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS. J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Biologia Molecular da Célula**. 5ª Edição, Porto Alegre (RS), Artmed, 2010.

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

ALMEIDA, S. P. de; PROENÇA C. E. B.; SANO M.; RIBEIRO J. F. **Cerrado: espécies vegetais úteis**. Planaltina: Embrapa-CPAC, 464p. 1998.

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 norvegicus*, Linhagem Wistar) *in vivo*. **Revista de Biologia e Ciência da Terra**, v. 5, n. 2, p. 1-11, 2005.

ALMEIDA, D. A.; VIEIRA, M. E. L. **Avaliação preliminar da genotoxicidade de filtro solar em *Astyanax* sp.** 2013. 48f. Monografia (Trabalho de conclusão de curso em Química Tecnológica com Ênfase em Química Ambiental) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, Curitiba, 2013.

AL-SABTI, K. Micronuclei induced by selenium, Mercury, methylmercury and their mixtures in binucleated blocked fish erythrocyte cells. **Mutat. Res.** v. 320, p. 157-163, 1991.

ALVES, T. M. A., et al. Biological screening of brazilian medicinal plants. **Memorial Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, n.3. p. 367-373, 2000.

ANDRADE-VIEIRA, L. F. et al. Spent Pot Liner Z (SPL) induced DNA damage and nuclear alterations in root tip cells of *Allium cepa* as a consequence

of programmed cell death. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 74, n. 4, p. 882–888, 2011.

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

ANDERSON, D.; YU, T-W.; MCGREGOR, D. B. Comet assay responses as indicators of carcinogenic exposure. **Mutagen** 13:539-555, 1998.

ANSARI, R. A.; RAHMAN, S.; KAUR, M.; ANJUM, S.; RAISUDDIN, S. *In vivo* cytogenetic and oxidative stress-inducing effects of cypermethrin in freshwater fish, *Channa punctata* Bloch. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, p. 50-156, 2011.

ANVISA. 2010. Guia para a condução de estudos não clínicos de segurança necessários ao desenvolvimento de medicamentos. **Gerência de Avaliação de Segurança e Eficácia – GESEF**. Brasília.

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

ARAÚJO, K. B.; SANTOS, R. C. A.; SOUZA, F. M.; AQUINO, L. C. L. 2011. Enriquecimento proteico da farinha de sementes de mangaba com *Rhizopus oryzae*: otimização utilizando a metodologia de superfície de resposta. **Tecnologia & Ciência Agropecuária**, João Pessoa, v. 5, n. 4, p. 45-50.

ARAÚJO, E. J. F.; ARAÚJO, D. Y. M. L.; FREITAS, R. M.; FERREIRA, P. M. P. 2014. Aspectos toxicológicos da planta medicinal *Casearia sylvestris* Swartz: revisão de literatura. **Revista de Ciências farmacêuticas Básica Aplicada**, 35 (3), p. 355-361.

ARORA, S.; BRITS, E.; KAUR, K.; SOHI, R. S.; KUMAR, S.; VERSCHEVE, L. Evaluation of genotoxicity of medicinal plant extracts by the comet and Vitotox (R) test. **J Environ Pathol Toxicol Oncol**, 24, p. 193-200, 2005.

BAGATINI, M. et al. Uso do sistema teste de *Allium cepa* como bioindicador de genotoxicidade de infusões de plantas medicinais. **Rev. bras. Farmacognosia**, João Pessoa, v.17, n.3, p. 444-447, 2007.

BRAGANÇA L. A. R. (org), **Plantas medicinais antidiabéticas: uma abordagem multidisciplinar**. São Paulo: EDUFF, Niterói, p. 10-25, 1996.

BRASIL. 2004. Ministério de Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução de Diretoria Colegiada nº 48 de 16 de março de 2004. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, 16. Março 2004.

BRASIL. 2006. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciências, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. **A fitoterapia no SUS e o Programa de Pesquisa de Plantas Medicinais da Tecnologia e Insumos Estratégicos do**

Departamento de Farmacêutica. Brasília: Ministério da Saúde. 148 p. (Série B. Textos Básicos de Saúde) p. 61,78 e 99.

BRASIL. 2006b. Ministério da Saúde. Decreto nº 5.813, de 22 de junho de 2006. Aprova Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF.

BRASIL. 2011. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Coordenação Nacional de Práticas Integrativas e complementares. *Relatório de Gestão: 2006/2010. Práticas integrativas e Complementares no SUS.* Brasília: Ministério da Saúde 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Práticas Integrativas e Complementares: plantas medicinais e fitoterapia na atenção básica. Brasília: Ministério da Saúde. (Série A. Normas e Manuais Técnicos) (Cadernos de Atenção Básica, n. 31), 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fitoterapia no SUS. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/>. Acesso em: 15 out. 2016.

BELCAVELLO, L. et al. Citotoxicidade e danos ao DNA induzidos pelo extrato de *Zornia diphylla*, uma planta medicinal. Cytotoxicity and DNA damages induced by the *Zornia diphylla* extract, a medicinal plant. **Natureza on line**, Santa Tereza, v. 10, p. 140-145, 2012.

BRUNING, M. C. R.; MOSEGUI, G. B. G.; VIANA, C. M. M. A utilização da fitoterapia e de plantas medicinais em viturdes básicas de saúde nos municípios de Cascavel e Foz do Iguaçu-Paraná: a visão dos profissionais da saúde. **Ciência e Saúde coletiva**, v. 17, n. 10. P. 2.675-2.685, 2012.

BOLOGNESI, C.; HAYASHI, M. Micronucleus assay in aquatic animals. **Mutagenesis**, 26, p. 205-213, 2011.

BORRÁS, M. R. L. **Plantas da Amazônia: medicinais ou mágicas? plantas comercializadas no mercado municipal Adolpho Lisboa.** Manaus: Valer, 2003. 322p.

BÜCKER, A; CARVALHO, W.; ALVES-GOMES, J. A. Avaliação da mutagênese e genotoxicidade em *Eigenmannia virescens* (Teleostei: Gymnotiformes) exposto ao benzeno. **Acta Amazonica**, v. 36 (3), p. 357-364, 2006.

CABRERA, G. L.; RODRIGUES, D. M. G. Genotoxicity of soil from farmland irrigated with wastewater using three plant bioassays. **Mutat Res.** 426, p. 211-214, 1999.

CALIXTO, J. B. Twenty-five of research on medicinal plants in Latin America. **J Ethnopharmacol**, v. 100 p. 131-134, 2005.

CAMPAROTO, M. L.; TEIXEIRA, R. O.; MANTOVANI, M. S.; VICENTINI, V. E. P. Effects of *Maytenus ilicifolia* Mart. and *Bauhinia candicans* Benth infusions on onion rootip and rat bone-marrow cell. **Genet Mol Biol**, v. 25, p.85-89, 2002.

CARITÁ, R. & MARIN-MORALES. M. A. 2008. Induction of chromosome aberrations in the *Allium cepa* test system caused by the exposure of seeds to industrial effluents contaminated with azo dyes. **Chemosphere**, 72(5): 722-725.

CARITÁ, R. **Avaliação do potencial genotóxico e mutagênico de amostras de águas de recursos hídricos que recebem efluentes urbanos e indústrias do polo ceramista da cidade de Santa Gertrudes – SP.** 2010. 187f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociência, Rio Claro, 2010.

CAVALCANTE, G. S.; LIBERATO, H. R.; MARTINS, A. L. M.; MARTINS, V. C.; CÂMARA NETO, J. F.; VIEIRA, I. G. P.; MORAIS, S. M. Prospecção fitoquímica, toxicidade frente à *Artemia salina*, e avaliação das atividades antioxidante e anticolinesterásica do extrato aquoso das vagens de *Caesalpinia ferrea* Mart. (jucá). 55º Congresso Brasileiro de Química, Goiânia, Goiás, 2015.

CAVALHEIRO, M. G.; FARIAS, D. F.; FERNANDES, G. S.; NUNES, E. P.; CAVALCANTI, F. S.; VASCONCELOS, I. M.; MELO, V. M. M.; CARVALHO, A. F. U.; Atividades biológicas e enzimáticas do extrato aquoso de sementes de *Caesalpinia ferrea* Mart., Leguminosae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 19, n.2b, jun. 2009. Disponível em; http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102695X2009000400014&Ing=en&nrm=iso. Acesso em: 01 jul.2016.

CAROLINA, R. S. **Genética Toxicológica da Chalcona sulfonamida (CPN): evidências de genotoxicidade e anti-mutagenicidade em diferentes sistemas-teste *in vivo* e *in vitro*.** 2015. 88f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2015.

CARVALHO, J. C. T. ***Caesalpinia ferrea* (pau-ferro): avaliação da atividade anti-inflamatória e analgésica.** 1993. 72 f. Dissertação (Mestrado em Fármacos e Medicamentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 1993.

CARVALHO, J. C. T.; TEIXEIRA, J. S. R. M.; PERGETINO, J. C.; SOUZA, C.; JAIRO, K. Preliminary studies of analgesic and anti-inflammatory properties of *Caesalpinia ferrea* crude extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 53, p. 175-178, 1996.

CARVALHO, W. A. Analgésico, antipiréticos e anti-inflamatórios. In: SILVA, P. **Farmacologia**. 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p. 431-455.

CARVALHO, M. B.; RAMIREZ, A.; GATTAS, G. J. F.; GUEDES, A. L.; AMAR, A.; RAPOPORT, A. BARAUNA NETO, J. C.; CURIONI, A. O. Correlação entre a evolução clínica e a frequência de micronúcleos em células de pacientes portadores de carcinomas orais e da orofaringe. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, 48: 317-322, 2002.

CEPPI, M.; BIASOTTI, B.; FENECH, M.; BONASSI, S. Human population studies with the exfoliated buccal micronucleus assay: statistical and epidemiological issues. **Mutat. Res.** 705, p. 11-19, 2010.

COELHO, R. G. **Estudo Químico de *Zollernia ilicifolia* (Fabacea), *Wilbrandia ebracteata* (Cucubitacea) e *Caesalpinia ferrea* (Caesalpiniaaceae).** 2004. 181 f. Tese (Doutorado em química) – Universidade Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2004.

COLAVATTI, F. Poder verde. **Revista Galileu**, Rio de Janeiro, nº 129, abril. p. 53-64, 2002.

COLLINS, A. R.; DUSINSKA, M.; GEDIK, C. M.; STETINA, R. Oxidative damage to DNA: Do we have a reliable biomarker? **Environ Health Prospect.** 104 (S3): 465-469. 1996.

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

CORRÊA, A.D.; BATISTA, R. S.; QUINTAS, L. E. M. **Plantas medicinais: do cultivo à terapêutica.** 7ª ed. Rio de Janeiro: vozes 2008.

CORRÊA, A. X. R. et al. Genotoxicity assessment of particulate matter emitted from heavy-duty diesel-powered vehicles using the in vivo *vicia faba* L. micronucleus test. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 127, p. 199-204, 2016.

CORTEZ, A. C. A. **Avaliação da atividade “in vitro” dos extratos fitoquímicos de *Caesalpinia ferrea* Martius e *Senna reticulata* (Willd.) Irwin & Barneby (Fabales Caesalpiniaaceae) para *Leishmania* spp. E *Trichophyton* spp.** 2004. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2004.

COSTA, R. M. A.; MENK, C. F. M. Biomonitoramento de mutagênese ambiental. **Biociência: Ciência & Desenvolvimento**, v. 2, n. 12, p. 24-26, 2000.

DA CRUZ, A. D.; McARTHUR, A. G.; SILVA, C. C.; CURADO, M. P.; GLICKMAN, 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, C. C.; DA CRUZ, A. D. Genotoxicidade da Triancinolona e do nitrado de prata em linfócitos utilizando o teste cometa. **Estudos**, Goiânia, 339, n. 2, p. 155-163, abril/jun. 2012.

DEVENTER, K. Detection of genotoxic effects on cells of liver and gill of *B. rerio*. By means of Single Cell Gel Electrophoresis. **Environ. Contam. Toxicol.** v. 56, p. 911-918, 1996.

DHAWAH, A.; BAIPAYEE, M.; PARMAR, D. Comet assay: a reliable tool for the assessment of DNA damage in different models. **Cell Biology and Toxicology**, 25, p. 5-32, 2008.

DE PAULA, J. R.; BARA, M. T. F. Apostila de Aulas Práticas (Farmacognosia) Faculdade de Farmácia – Universidade Federal de Goiás, Goiânia – GO, 2005.

DI STASI; L. C.; HIRUMA-LIMA, C. A. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica.** 2ed. São Paulo: UNESP, 2002. 607p.

DIAS, M. G.; CANTO-DOROW, T. S.; COELHO, A. P. D.; TEDESCO, S. B. Efeito genotóxico e antiproliferativo de *Mikania cordifolia* (L. F.) Willd. (Asteraceae) sobre o ciclo celular de *Allium cepa* L. **Rev. Bras. Plantas Medicinai**s, Campinas, v. 16, n. 2, p. 203-208, 2014.

DUARTE, E. C. **Desenvolvimento de extrato seco padronizado de frutos sem semente de *Caesalpinia ferrea* C. Mart. E avaliação da atividade anti-inflamatória.** 2010. 110f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2010.

EIGENMANN, C. H. The American Characidae. Memoirs of the Museum of Comparative Zoology (Harvard College), 1921. In: AGOSTINHO, A. A.; GOMES, L. C. **Reservatório de Segredo: bases ecológicas para o manejo.** Maringá: EDUEM, v. 43, n. 3, p. 209-310, 1997.

EIGENMANN, C. H. The American Characidae. Memoirs of the Museum of Comparative Zoology (Harvard College), 1927. In: AGOSTINHO, A. A.; GOMES, L. C. **Reservatório de Segredo: bases ecológicas para o manejo.** Maringá: EDUEM, v. 43, n. 4, p. 311-428, 1997.

FABRI, R. L.; COSTA, J. A. B. M. Perfil farmacognóstico e avaliação das atividades citotóxicas e antibacteriana de *Bromélia antiacantha* Bertol. **Revista Eletrônica de farmácia**, v.9, n. 2, p. 37-48, 2012. Disponível em: <http://www.revistas.ufg.br/index.php/REf/article/viewFile/18427/11193>. Acesso em: 12 set. 2016.

FACHINETTO, J. M.; BAGATINI, M. D., DURIGON, J.; SILVA, A. C. F.; TEDESCO, S. B. Efeito anti-proliferativo das infusões de *Achyrocline satureioides* DC (Asteraceae) sobre o ciclo celular de *Allium cepa*. **Revista Brasileira Farmacognosia**, 17(1): 49-54. 2007.

FARIAS, E. M. F. G. Avaliação da toxicidade aguda do extrato metanólico de folhas de *Lippia sidoides* Cham. (Verbenaceae) In: CONGRESSO BRASILEIRO DE QUÍMICA. Sociedade Brasileira de Química, Natal, 2007.

FARIAS, R. A. P. G.; COELHO, M. F. B.; ALBUQUERQUE, M. C. F.; AZEVEDO, R. A. B. Fenologia de *Brosimum gaudichaudii* Trécul. (Moraceae) no cerrado de Mato Grosso. **Ciência florestal**, Santa Maria, v. 25, n. 1. P. 67-75, jan/mar, 2015.

FARIAS, R. A. P. G.; SILVA, A. N.; ALBUQUERQUE, M. C. F.; COELHO, M. F. B. Características biométricas e emergência de plântulas de *Brosimum gaudichaudii* Tréc. Oriundas de diferentes procedências do Cerrado mato-grossense. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, Botucatu, v.11, n. 4, p. 414-421, 2009.

FARIAS, R. A. P. G. **Fenologia distribuição espacial, germinação e produção de mudas de *Brosimum gaudichaudii* Trécul. (Moraceae).** 2009. 128f. Tese (Doutorado em Agricultura Tropical) – Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, MT, 2009.

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research Fundamental and Molecular Mechanism of Mutagenesis.** Amsterdam, v. 455, n. 1-2, p. 81-95, 2000.

FERNANDES, T. C. C. **Investigação dos efeitos tóxicos, mutagênicos e genotóxicos do herbicida trifluralina, utilizando *Allium cepa* e *Oreochromis niloticus* como sistemas-**

testes. 2005. 212f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Instituto de Biociências. Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, SP, 2005.

FERNANDES, T. C. C.; MAZZEO, D. E. C.; MARIN-MORALES, M. A. Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cell of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. **Pesticide Biochemistry and Physiology**. San Diego, Calif, v. 88, n 3, p. 252-259, July 2007.

FERNANDES, C. A.; MARTINS-SANTOS, I. C. Cytogenetic studies in two populations of the *Astyanax altiparanae* (Pisces, Characiformes). **Hereditas** 141: p. 328-332.

FIGUEIREDO, D. R. de. Avaliação da citotoxicidade do extrato hídrico da erva doce (*Pimpinella anisum L.*) através do teste em *Allium cepa L.* 2014.

FIGUEIREDO, F. R. G. **Ensaio mutagênico em decocto de *Cochlospermum regium* (Mart. et. Schr.) Pilger (Bixaceae) em *Poecilia reticulata* e linfócitos humanos.** 2012. 115f. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais e Saúde) – Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Goiânia, 2012.

FISKESJÖ, G. The Allium test - an alternative in environmental studies: the relative toxicity of metal ions. **Mutation Research – Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 197, n. 2, p. 243–260, 1988.

FISKESJÖ, G. The *Allium cepa* test in wastewater monitoring. **Environmental Toxicology and Water Quality**, New York, v.8, p.291-298, 1993.

FLORES, M.; YAMAGUCHI, M. U. Teste do micronúcleo: uma triagem para avaliação genotóxica. **Revista Saúde e Pesquisa**, v. 1, n. 3, p. 337-340, set./dez, 2008.

FRANCISCO, K. M. S. Fitoterapia: uma opção para o tratamento odontológico. **Revista Saúde**, Universidade Guarulhos, 4(1) 2010. Disponível em: <revistas.ung.br/index.php/saude/article/download/432/631>. Acesso em: 18 de abril 2016.

FREITAS, A. C. C. **Atividades biológicas de preparações obtidas de *Libidibia (Caesalpinia) ferrea* var. *parvifolia* (Mart. ex Tul.) L. P. Queiroz.** 2012. 140f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2012.

FRÖHNER, C. R. A. **Avaliação da citotoxicidade da genotoxicidade e da potencial atividade antiviral da violaceína, produzida pela *chromobacterium violaceum*.** 2003. 135f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis 2003.

FUNARI, C. S.; FERRO, V. O. Uso ético da biodiversidade brasileira: necessidade e oportunidade. **Rev Bras Farmacogn.**15: 178-182. 2005.

GALVAN, G. L. **Avaliação genotóxica de efluentes químicos de laboratórios de instituição de ensino e pesquisa utilizando como bioindicador o peixe *Astyanax altiparanae* (Characidae).** 2011. 89f. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Conservação) Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

GARUTTI, V.; BRITSKI, H. A. Descrição de uma espécie nova de *Astyanax* (Teleostei: Characidae) da bacia do alto rio Paraná e considerações sobre as demais espécies do gênero na bacia. **Comunicações do Museu de Ciências**. 13: p. 65-88. 2000.

GÈRY, J. **Characoids of the world**. Neptune City: T.F.H. Publ., 1977.

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

GIONGO, P. **Estudos citogenéticos em peixes do gênero *Astyanax* (Teleostei: Characiformes) das bacias dos rios Paraguai, Araguaia e Alto Paraná**. 2014. 61f. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) – Universidade Federal de Viçosa, MG, Viçosa, 2014.

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.

GRISOLIA, C. K.; RIVERO, C. L. G.; STARLING, F. L. R. M.; SILVA, I. C. R.; BARBOSA, A. C.; DOREA, J. G. Profile of micronucleus frequencies and DNA damage. Caderno de Pesquisa. **Série Biologia**, volume 23, número 1.

GROVER, I. S.; KAUR, S. Genotoxicity of wastewater samples from sewage and industrial effluent detected micronucleus assays. **Mutat Res**. 426: p. 183-188, 1999.

GUERRA, M. SOUSA, M. J. **Como observar cromossomo: um guia de técnica em citogenética vegetal, animal e humana**. São Paulo, Funpec, 131 p. 2002.

GUERRA, R. C. **Estudos do lodo gerado em reator biológico, pelo tratamento da água de produção do petróleo, no Terminal Marítimo almirante Barroso, município de São Sebastião, SP. visando sua disposição final**. 2009. 126p. Tese (Doutorado) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro/ SP, 2009.

GODINHO, C., SILVA, M., MENDES, C., FERREIRA, P.; OLIVEIRA, D. Estudo fitoquímico de espécies arbóreas do cerrado. **Revista Multitexto**, 3, fev. 2016. Disponível em: <<http://www.ead.unimontes.br/multitexto/index.php/rmcead/article/view/145>>. Acesso em: 20 Nov. 2016.

GONZALEZ, F. G.; BARROS, S. B. M.; BACHI, E. M. Atividade antioxidante e perfil fitoquímico de *Caesalpinia ferrea* Mart. In: IX semana Farmacêutica de Ciências e Tecnologia da FCF-USP, 2004. São Paulo, **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, v. 40, p. 79, 2004.

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

GURGEL, H. C. B. Estrutura populacional e época de reprodução de *Astyanax fasciatus* (Cuvier) (Characidae, Tetragonopterinae) do rio Ceará Mirim, Poço Branco, Rio grande do Norte, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, 21 (1), p. 131-135, 2004.

HADDAD JUNIOR, V. Skin manifestation caused by brasilian traumatic, allergenic, and venomous plants: main species, therapeutic and preventive. **The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 10, p. 199-206, 2004.

HARTMANN, A.; SPEIT, G. The contribution of cytotoxicity to DNA- effects in the single cell gel test (Comet assay). **Toxicology Letters**, v. 90, p.183-188, 1997.

HASHIMOTO, G. (ed.): “Illustrated Cyclopedia of Brazilian Medicinal Plants” Aboc-Sha, Kamakura, p. 646, 1996.

HERRERO, O. et al. Toxicological evaluation of three contaminants of emerging concern by use of the *Allium cepa* test. **Mutation Research**. 743, p. 20-24, 2012.

HUANG, Y.; FENECH, M.; SHI, Q. Micronucleus formation detected by live-cell imaging. **Mutagenesis**, 26(1): 133-8, 2011.

[https:// brasilienexkursion.Wordpress.com2011/03/13/petriheil-im-patanal-die-artenvielfalt-im-temporargewasser](https://brasilienexkursion.wordpress.com/2011/03/13/petriheil-im-patanal-die-artenvielfalt-im-temporargewasser). **SITE** Acesso 8 de fev. 2017.

ILDIS: banco de dados Disponível em < <http://www.ildis.org/Legumeweb?> Version~3 10.01. Acesso em: 13 nov. 2016.

JACOMASSI, E.; MOSCHETA, I. S.; MACHADO, S. R. **Morfoanatomia e histoquímica de Brosimum gaudichaudii Trécul (Moraceae)**. Acta bot. Bras. 21 (3): 575-597. 2007. Parte da tese de Doutorado da primeira autora, Universidade Estadual Paulista- Campos de Botucatu.

KALANTARI, H. et al., Determination of the mutagenicity potential of Dillsum Herbal medicine by single cell gel electrophoresis in rat hepatocytes. **Jundishapur Jornal of Natural Pharm Prod**. 8 (2), 2013.

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

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

KOBAYASHI, Y, T. S. *et al.*, Avaliação fitoquímica e potencial cicatrizante do extrato etanólico dos frutos de Jucá (*Libidibia ferrea*) em ratos Wistar. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.** São Paulo, v. 52, n 1, p. 34-20, 2015.

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

LAPA, A. J. Farmacologia e toxicologia de produtos naturais. In: Simões C. M. O. (Ed). **Farmacognosia da planta ao medicamento**, Florianópolis Editora da Universidade Federal de Santa Catarina, p. 181-196, 1999.

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.

LEÃO, A. R.; CUNHA, L. C.; PARENTE, L. M. L.; CASTRO, L. C. M.; CHAUL, A.; CARVALHO, H. E.; RODRIGUES, V. B.; BASTOS, M. A. Avaliação clínica e toxicológica preliminar do viticromim[®] em pacientes com vitiligo. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 2, p. 15-23, 2005.

LEITE, K. A. S.; ZANDONATO, V. V.; FLUMINHAN, A. Avaliação da genotoxicidade provocada por fatores ambientais em *Tradescantia pallida* cv purpúria através do ensaio cometa. In: **IX fórum Ambiental da Alta Paulista**. v.9, n.11, p.399-417, 2013. Disponível em:http://www.amigosdanatureza.org.br/publicacoes/index.php/forum_ambiental/article/view/File/686/710. Acesso em: 28 jul. 2016.

LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. *Allium cepa* test in environmental monitoring : A review on its application. **Mutation Research**. Amsterdam, v. 682, p. 71–81, 2009.

LIMA, E. C.; CURY, A. E.; FISCHMAM, O. G.; GIESBRECHT, A. M.; PAULO, M. Q. Atividade antifúngica de extratos de plantas medicinais sobre *Trichophyton*, *Microsporium* e *Epidermophyton* isolados de pacientes com dermatofitose. 13 th. **Brazilian Symposium in Medicinal Plants**. Ceará, Brasil, 1994.

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.

LIMA, D. J. B. **Estudo da atividade anticâncer da marinobufagenina, um bufadienolídeo extraído de anfíbios da espécie *Rhinella marina***. 2016. 90f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2016.

LIMA, F. C. T.; MALABARBA, L. R. et al. **Genera Incertae Sedis In Characidae** In Reis R. E. Kullander S. O. Ferraris J. R. C. J. Check list of the freshwater fishes of South and Central America EDIPUCRS, Porto Alegre, RS, p. 106-169, 2003.

LOURENÇO, M. V. **Estudo comparativo dos constituintes químicos de *Brosimum gaudichaudii* Tréc. E do medicamento “V”**. 2001. 121f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química Universidade Estadual Paulista. Araraquara, SP. 2001.

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

LORENZI, H.; MATOS, J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. 2. ed. Nova Odessa, SP, Instituto Plantarum, 520p. 2009.

LOUVATEL, K.; ZAIONS, M. I. M.; ARENHART, A. R. Avaliação da citotoxicidade e Genotoxicidade dos extratos de *Stachys byzantina* c. kock (pulmonária) e *Tropeolum majus*

L. (capuchinha), utilizando o sistema teste *Allium cepa*. **Unoesc & Ciências - ACBS**. Edição Especial. P.29-34, 2014.

LUZ, A. C.; PRETTI, I. R.; DUTRA, J. C. V.; BATITUCCI, M. C. P. Avaliação do potencial citotóxico e genotóxico de *Plantago major* L. em sistemas teste *in vivo*. **Rev. Bras. Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 14, n. 4, p. 635-642, 2012.

MA, T.H.; XU, Z. Validation of a new protocol of the *Allium* micronucleus test for clastogens. **Environmental Mutagenesis**, v.8, n. 6, p. 65-66, 1986.

MA, T.H.; XU, C.; McCONNELL, H.; RABAGO, E. V.; ARREOLA, G. A.; ZHANG, H. The improved *Allium/Vicia* root tip micronucleous assay for clastogenicity of environmental pollutants. **Mutation Research**, Amsterdam, v.334, n.2, p.185-195, 1995.

MACEDO, J. F. M.; SILVA, M. S.; BATISTA, N. J. C.; UCHOA, V. T.; ALVES, W. S. Estudo da genotoxicidade do extrato de *Abelmoschus esculentus* (quiabo) pelo teste de *Allium cepa*. **Revista Saúde em foco**, Teresina, v.1, n. 1, art, 2, p. 15-28, 2014.

MACEDA, E. B.; GRISOLIA, A. B.; VAINI, J. O.; CANDIDO, L. S. Uso de biomarcadores para monitoramento das águas do Córrego Arara no município de rio Brilhante, MS, Brasil. **Ambiente & Água - An Interdisciplinary Journal of Applied Science** [en linea] 2015, 10 (Enero-Marzo):Disponível em: <<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=92832874011>> ISSN 1980-993X. Acesso 16 de fevereiro 2017.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA, V. F. Jr. Plantas Mediciniais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**. São Paulo, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

MAGALHÃES, L. S.; PUSSENTE, C. G.; AZEVEDO, L. R.; CRESPO, J. M. R. S. Avaliação da atividade antibacteriana do extrato de *Caesalpinia ferrea* Martius e desenvolvimento de uma formulação fitocósmética. **Revista Científica da Faminas**, v. 11, n. 1, jan/abr, 2015.

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.**

MARCON, L. **Morfologia ovariana no lambari *Astyanax bimaculatus* sob efeito do hormônio de crescimento**. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Viçosa; 2008.

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

MARQUES, R. C. P.; MEDEIROS, S. R. B.; DIAS, C. S.; BARBOSA-FILHO, J. M. & AGNES-LIMA, L. F. Evaluation of the mutagenic potential of yangambin and of the hydroalcoholic extract of *Ocotea duckii* by the test Ames. **Mutation Research**, v. 536: p. 117-120, 2003.

MARTINS, L.; PAZ, A. V.; BRENTANO, D. M. Avaliação da geração de micronúcleo em juvenis de *Centropomus parallelus* (Robalo-peva) expostos a diferentes concentrações salinas. **RTC**, Florianópolis, SC, v. 02, n. 01, p. 13-16, 2010.

MATSUMOTO, S. T. S. S. T. et al. Contaminated with tannery effluents, as evaluated by the micronucleus test and comet assay using the Fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations. **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, n. 1, p. 148-158, 2006.

MATOS, F. J. A. **Introdução à Fitoquímica Experimental**. Fortaleza CE, Edições UFC, p.128, 1988.

MITCHELMORE, C. L.; CHIPMAN, J. K. DNA strand breakage in aquatic organismo and the potential value of the comet assay in environmental monitoring. **Mutat. Res.**, v.399, p. 135-147, 1998.

MONTEIRO, V.; CAVALCANTE, D. G. S. M.; VILÉLA, M. B. F. A.; MARTINEZ, C. B. R. In vivo and in vitro exposures for the evaluation of the genotoxic effects of lead on the Neotropical freshwater fish *Prochilodus lineatus*. *Aquatic toxicology*, v. 104, n.3, p. 291-298, 2011.

NACCI, D.; 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.

NAKAMURA, E. S.; KUROSAKI, U.; ARISAWA, M.; MUKAINAKA, T.; TAKAYASU, J.; OKUDA, M.; TOKUDA, H.; NISHINO, H.; FLORIANO PASTORE, F. Cancer chemopreventive effects constituents of *Caesalpinia ferrea* and related compounds. **Cancer Letters**, v. 177, p. 119-124, 2002^a

NAKAMURA, E. S.; KUROSAKI, F.; ARISSAWA, M.; MUKAINAKA, T.; TAKAYASU, J.; OKUDA, M. TOKUDA, H.; NISINHO, H.; PASTORE, J. R. F. Cancer chemopreventive effects of a brazilian folk medicine, juca, on *in vivo* two-stage skin carcino genesis. **Journal of Ethnopharmacology**, 81, p. 135-137, 2002^b.

NASCIMENTO, M. P. S. C. B et al. Potencial forrageiro do pau-ferro. In Boletim de pesquisa e desenvolvimento, 41. Teresina: Embrapa, Outubro, p. 16. 2002.

NAVARRO-MOLL, M. C. Uso racional de las plantas medicinales. **Pharmaceutical Care**, Barcelona, v. 2, p. 9-19, 2000.

NEVES, M. L. P.; FERREIRA NETO, P. G.; SILVA, S. M. S. et al. Ensaio para detectar bergapteno na casca e no caule de *Brosimum gaudichaudii* Tréc. Através da produção de melanina em actinomecetos. **Revista Brasileira de farmacognosia**, v. 12, p. 53-54, 2002.

NOZAKI, H.; HAYASHI, K.; KIDO, M.; KAKUMOTO, K.; IKEDA, S.; MATSUURA, N.; TANI, H.; TAKAOKA, D.; IINUMA, M.; AKAO, Y. Pauferrol A, a novel chalcone trimer with a cyclobutane ring from *Caesalpinia ferrea* mart exhibiting DNA topoisomerase II inhibition and apoptosis-inducing activity. **Tetrahedron Letters**, v. 48, n. 47, p. 8290-8292, 19 nov, 2007.

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 (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2000.

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

OLIVE, P. L.; BANÁTH, J. P.; DURAND, R. E. Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumour and normal cells measured using the comet assay. **Radiat. Res.**, v. 122, p.69-72, 1990.

OLIVEIRA, A. F.; BATISTA, J. S.; PAIVA, E. S.; SILVA, A. E.; FARIAS, Y. J. M. D.; DAMASCENO, C. A. R.; BRITO, P. D.; QUEIROZ, S. A. C.; RODRIGUES, C. M. F.; FREITAS, C. I. A. Avaliação da atividade cicatrizante do jucá (*Caesalpinia ferrea* Mart. ex Tul. Var. *ferrea*) em lesões cutâneas de caprinos. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, Botucatu*, v. 12, n. 3, set. 2010. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttex&pid=S151605722010000300007&Ing=en&nrm=iso. Acesso em: 31 jul. 2016.

OLIVEIRA, A. F. et al. Avaliação da atividade cicatrizante do jucá (*Caesalpinia ferrea* Mart. ex Tul. Var. *ferrea*) em lesões cutâneas de caprinos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.12, set. 2010. Disponível em<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttex&pid=S151605722010000300007&Ing=en&nrm=isso>. Acesso 31 jul. 2016.

OLIVEIRA, A. K. M.; OLIVEIRA, N. A.; RESENDE, U. M.; MARTINS, P. F. R. B. Ethnobotany and traditional medicine of the inhabitants of the Pantanal Negro sub-region and the raizeiros of Miranda and Aquidauna, Mato Grosso do Sul, Brazil. **Braz J Biol.** 71 (Suppl. 1): 283-9, 2011.

OLIVEIRA, C. C. **Estudos toxicológicos pré-clínicos e antitumorais do extrato acetônico das folhas de *Annona muricata* L.** 2012. 180f. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2012.

OLIVEIRA, G. L.; OLIVEIRA, A. F. M.; ANDRADE, L. H. C. Plantas medicinais utilizadas na comunidade urbana de Muribeca. Norte do Brasil. **Acta Bot Bras.** 24 (2): 571-7, 2010.

OLIVEIRA, I. V. P. M. Avaliação cicatricial macroscópica da vagem e da casca do jucá (*Caesalpinia ferrea* Mart. ex Tul. Var. *ferrea*) em lesões cutâneas em asininos (*Equus asinus*). **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 8, n. 2, p. 129-135, 2014.

OLIVEIRA, et al. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais utilizadas pelos moradores do povoado de Manejo, Lima Duarte – MG. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Botucatu, v. 14. n. 2, p. 311-320, 2012.

OLIVEIRA, L. M.; VOLTOLINI, J. C.; BARBÉRIO, A. Potencial mutagênico dos poluentes na água do rio Paraíba do Sul em Tremembé, SP, Brasil, utilizando o teste *Allium cepa*. **Ambi-Agua**, Taubaté, v. 6, n. 1, p. 90-103, 2011.

OMS 2011. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Medicines: International Cooperation and Harmonization. Organização Mundial da Saúde; 2011 [23 de outubro de

2014]. Disponível em: http://www.who.int/medicines/areas/quality_safety/regulation/harmonization/en/index.html.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS); unión mundial para la natureleza (uicn), world wildlife fund (WWF). 1993. Diretrizes sobre conservação de plantas medicinales. Londres: Media Natura. 58p.

ORSI, M. L.; CARVALHO, E. D.; FORESTI, F. Biologia populacional de *Astyanax altiparanae* Garutti & Britski (Teleostei, Characidae) do médio Rio Paranapanema, Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, 21 (2): 207-218. 2004.

OSTLING, O.; JOHANSON, K. J. Study of radiation- induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, v. 123, p. 291-298, 1984.

PALHARES, D. **Morfologia e anatomia do caule e do sistema subterrâneo de *Brosimum gaudichaudii***. 2004. 76f. Dissertação de (Mestrado) – Universidade de Brasília. 2004.

PATWARDHAN, B. Ethnopharmacology and drug Discovery. **Journal of Ethnopharmacology**. Lausanne, v. 100, P. 50-52, 2005.

PERON, A. P.; FELIPES, L.; MATTAGE, G. I.; CANTAGALLI, L. B.; MAURIUCCI, 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.

PENTEADO, P. R. **Diversidade Cromossômica e molecular no gênero *Astyanax* (Characiformes: Characidae)**. 2011. 58f. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa MG, 2011.

PIMENTA, S. M. **Adubação em mamica-de-cadela (*Brosimum gaudichaudii* Tréc.)**. 2002. 47f. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical) – Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá-MT, 2002.

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 de Porto. 2010.

PINHEIRO, E. M.; COQUEIRO, M. M. M.; MOUCHRECK FILHO, V. E.; NASCIMENTO, A. R.; SCHALCHER, A. G. Estudos fitoquímicos, citotóxico e atividade antimicrobiana do fruto do jucá (*Caesalpinia ferrea*) In: IX CONNEPI – Congresso Norte Nordeste de Pesquisa e Inovação. **Resumos Expandidos**. São Luís – MA, 2014.

PINHO, D. S.; STURBELLE, R. T.; MARTINO-ROTH, M. G.; GARCIAS, G. L. Avaliação da atividade mutagênica da infusão de *Baccharis trimera* (Less.) DC. Em teste de *Allium cepa* e teste de aberrações cromossômicas em linfócitos humanos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 20 (2), p. 165-170, 2010.

POLETTO, P. O.; DINIZ, A. P.; BERNARDON, B.; ZAN, R. A.; RAMOS, L. J.; MENEGUETTI, D. U. O. Análise da mutagenicidade do extrato hisrossolúvelde *Derris*

rariflora (Mart. ex Benth, J> F> Macbr: Fabaceae), Timbó Amazônico, através do teste micronúcleo em *Allium cepa*, **Revista Pesquisa & Criação**, v. 10, n. 1, p. 163-175, 2011.

PORTELA, A. C.; SOUZA, L. A. G.; LOPES, M. C. Organização do germoplasma de leguminosas arbóreas do INPA/CPCA: fenologia e desenvolvimento inicial das espécies. In: Jornada de Iniciação Científica, 10.1, PIBIC CNPq/INPA, **Resumos Expandidos**, p. 223-226. Manaus, 2001.

POZETTI, G. L. *Brosimum gaudichaudii* Trecul (Moreceae): da planta ao medicamento. **Revista de ciências farmacêuticas básica e aplicada**. v. 6. N. 3. P. 159-166. 2005.

RAMSDORF, W. **Avaliação da toxicidade dos compostos fipronil, nitrato de chumbo e naftaleno em peixes**. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

RAMSDORF, W. **Utilização de duas espécies de *Astyanax* (*Astyanax sp B* e *A. Altiparanae*) como bioindicadores de região contaminada por agrotóxico (Fazenda Cangüiri – UFPR)**. Dissertação (Mestrado em Genética) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

RIBEIRO, J. E. L. S.; HOPKINS, M. J. G.; VICENTINI, A.; SOTHERS, C. A.; COSTA, M. A. S.; BRITO, J. M.; SOUZA, M. A. D.; MARTINS, L. H. P.; LOHMANN, L. G.; ASSUNÇÃO, P. A. C. L.; PEREIRA, E. C.; SILVA, C. F.; MESQUITA, M. R.; PROCÓPIO, L. C. **Flora da Reserva Ducke: guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra firme na Amazônia Central**. Manaus: INPA, 1999. 816p.

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.; SALVADORI, D.M.F.; MARQUES, E.K. **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.

RIVERO, C. L. G. **Perfil da frequência de micronúcleos e danos no DNA de diferentes espécies de peixes do lago Paranoá, Brasília – DF, Brasil**. 2007. 93f. Dissertação (Mestrado em Patologia Molecular) – Universidade de Brasília. 2007.

RODRIGUES, V. E. G.; CARVALHO, D. A. **Plantas medicinais no domínio dos cerrados**. Larvas: Editora UFLA, 2001.

RODRIGUES, V. E. G.; CARVALHO, D. A. **Plantas medicinais no domínio dos cerrados**. Lavras: Editora UFLA, 2001a, p. 180, 2001.

RODRIGUES, V. E. G.; CARVALHO, D. A. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais no domínio do cerrado na região do Alto do Rio Grande- Minas Gerais. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 25, p. 102-123, 2001b.

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

SAMPAIO, F. C.; PEREIRA, M. S. V.; DIAS, C. S.; COSTA, V. C. O.; CONDE, N. C. O.; BUZALAF, A. R. In vitro antimicrobial activity of *Caesalpinia ferrea* Martius fruits against oral pathogens. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 124, n 2, p. 289-294, 2009.

SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P. (Eds.) **Cerrado: ambiente e flora**. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, v.2, 1279p. 2008.

SANTOS, S. **Um estudo etnoecológico dos quintais da cidade de Alta Floresta- MT**. 2004. 165f. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, 2004.

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

SCALON, M. C. S.; RECHENMACHER, C. et al. Evaluation of Sinos River water genotoxicity using the comet assay in fish. **Braz. J. Biol.**, v. 70, n.4, (suppl.) p. 1217-1222, 2010.

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.

SILVA, F. D. B.; SALES, M. A. G.; SÁ, O. R. M.; SANTANA, G. M.; DEUS, M. S. M.; SOUSA, J. M. C.; FERREIRA, P. M. P.; PERON, A. P. Potencial citotóxico, genotóxico e citoprotetor de extratos aquosos de *Caesalpinia pyramidalis* Tul., *Caesalpinia pulcherrima* Sw. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 13, n. 2, p. 101-109, abri./jun. 2015.

SILVA, C. R.; MONTEIRO, M. R.; CALDEIRA, DE-ARAÚJO. A; BEZERRA, R. J. C.A. **Absence of mutagenic and citotoxic potentiality of senna (*Cassia angustifolia* Vahl.) evaluated by microbiological test**. *Rev Bras farmacogn* 14 (Supl. 1): 1-3. 2004.

SILVA, C. S.; NUNES, P. O.; MESCOUTO, C. S. T.; MÜLLER, R. C. S.; PALHETA, D. C.; FERNANDES, K. G. Avaliação do uso da casca do fruto e das folhas de *Caesalpinia ferrea* Martius como suplemento nutricional de Fe, Mn, Zn. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, Campinas, v. 30, n. 3, set. 2010. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010120612010000300028&Igem&nr m-isso. Acesso em: 28 jul 2016.

SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J. A. P. **Genética toxicológica**. Porto Alegre, Alcance. 422p. 2003.

SILVIA, D. B.; VIEIRA, R. F.; CORDEIRO, M. C. T.; PEREIRA, E. B. C.; PEREIRA, A. V. Propagação vegetativa de *Brosimum gaudichaudii* Tréc. (mama-cadela) por estacas de raízes. **Revista brasileira de Plantas medicinais**, Botucatu, v. 13, n. 2, p. 151-156, 2011.

SILVA, A. C.; NEPOMUCENO, J. C. Avaliação da frequência de micronúcleos em eritrócitos periféricos de mandi-amarelo (*Pimelodus maculatus*) do rio Paranaíba. **Rev. do**

Núcleo Interdisciplinar de Pesquisa e Extensão do UNIPAM, Patos de Minas, UNIPAM, v. 1, n. 7, p. 167-179, 2010.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, Porto Alegre: UFRGS, 5 ed., 2003, 1102 p.

SINGH, N. P. et al. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**. New York, v. 175, n. 1, p. 184-191, 1988.

SISINNO, C. L. S.; OLIVEIRA-FILHO, E. C. **Princípios de Toxicologia Ambiental**. 1 ed. Rio de Janeiro: Editora Interciência, 2013.

SOARES, E. F. A. **Abordagem fitoquímica da *Punica granatum* L. e a identificação de atividades antimicrobiana**. Monografia de Conclusão de Curso, São Luis, 2003.

SOUSA, V. M. S.; DIAS, V. L. N.; NASCIMENTO, I. O.; NUNES, S. E. A.; BELFORT, M. G. S. Caracterização fitoquímica para a proteção da flora local. In: Congresso Brasileiro de Agroecologia, VII, 2011, Fortaleza, **Resumo**, Fortaleza – CE: caderno de Agroecologia - ISSN 2236-7934, 2011, v. 6. n. 2.

SOUZA, L. A. G. **Leguminosas da Amazônia: jucá *Caesalpinia ferrea* C. Mart.** Manaus: Editora do INPA, 2007 (Folder).

SOUZA, V. H. E. **Avaliação da citotoxicidade, genotoxicidade e estresse oxidativos de efluentes de uma indústria de papel e celulose de Santa Catarina em *Allium cepa***. 2006. 160f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis 2006.

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 cell of Wistar rats. **Genet Mol Bio**, 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-FILHO, J. Efeitos tóxicos e genotóxicos do herbicida Roundup Transorb® em Guppy (*Poecilia reticulata*) submetido a tratamento agudo. 2011. F146. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Universidade Federal do Goiás.

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

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

TAKEOKA, G. R.; DAO, L. T. Antioxidant constituent of almond [*Prunus dulcis* (Mill.) D.A. Webb.] hulls. **J Agric Food Chem**, v.51, p. 496-501, 2003.

TEIXEIRA, R. O. et al. Assessment of two medicinal plants, *Psidium guajava* L. and *Achillea millefolium* L., *in vitro* and *in vivo* assays. **Genetics and Molecular Biology**. Ribeirão Preto. v. 26, n. 4, p. 551-555. 2003.

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.

TICE, R. R. The Single cell gel/ comet assay: a microgel electrophoretic technique for the detection of DNA damage and repair in individual cells, in: D.H. Phillips, S. Venitt (Eds.), Environmental Mutagenesis. **Bioscientific publishers**, Oxford, p.315-339, 1995.

TOLEDO, A. C. O.; HIRATA, L. L.; BUFFON, M. C. M.; MIGUEL, O. G. Fitoterápicos: uma abordagem farmacotécnica. **Lecta-USF**. 21, P. 7-13, 2003.

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.

UEDA, H.; TACHIBANA, Y.; MORIYASU, M.; KAWANISHI AND, K. S.; ALVES, M. Aldose reductase inhibitors from the fruits of *Caesalpinia ferrea* Mart. **Phytomedicine**, v.8, n. 5. P. 377-381, 2001.

VENTURA, B. C. et al. Mutagenic and genotoxic effects of the Atrazine herbicide in *Oreochromis niloticus* (Perciformes, Cichlidae) effected by the micronuclei test and the comet assay, **Pest. Biochem, Physio.** 90, 42-51, 2008.

VICENTINI, V. E. P.; CAMPAROTO, M. L.; TEIXEIRA, R. O.; MANTOVANI, M. S. *Averrhoa carambola* L., *Syzygium cumini* (L.) Skeels and *Cissus sicyoides* L.: medicinal herbal tea effects on vegetal and test systems. **Acta Scientiarum** v. 23, p. 593-598, 2001.

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

W. H. O. World Health Organization. Regulatory situation of herbal medicines. **A Worldwide Review**, Geneva: WHO, 1998, 45 p.

WYREPKOWSKI, C. C.; COSTA, D. L.; SINHORIN, A. P.; VILEGAS, W.; De GRANDIS, R. A.; RESENDE, F. A.; VARANDA, E. A. & SANTOS, L. C. Characterization and quantification of the compounds of the ethanolic extract from *Caesalpinia ferrea* stem bark and evaluation of their mutagenic activity. **Molecules**, 19 (10); 16039-16057, 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **The World medicines situation 2011:** traditional medicines: global situation, issues and challenges. Geneva: WHO; 2011.

WOLFF, L. L. **Estrutura Populacional Reprodutiva e Dinâmica Alimentar do lambari *Astyanax sp. b* (Characidae: Tetragonopterinae) em dois trechos do Rio das Pedras, Garapuava, Paraná.** 2007. 102f. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Conservação) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

XIMENES, N. C. A. **Purificação e Caracterização da Leticina da vagem de *Caesalpinia ferrea* (CfePI): Aplicação Biológica.** 2004. 53f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2004.

YUNES, R. A. **Plantas medicinais sob a ótica da moderna química medicinal.** 1 ed. Chapecó. Editora Argos. P. 523. 2001.

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

ZENKNER, F. F.; SOARES, A. P. T.; PRÁ, D.; KÖHLER, A.; RIEGER, A. Avaliação genotoxicológica em peixes nativos do rio Pardinho, RS, Brasil. **Caderno de pesquisa, Série Biologia**, Santa Cruz do Sul, v. 23, n. 1, p. 5-16, 2011.

8. ANEXOS

8.1. Anexo A – Aprovação do Comitê de Ética para *Astyanax* sp



Comissão de Ética no ⁸⁹ Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação do potencial genotóxico e mutagênico dos extratos padronizados de *Caesalpinia ferrea* (jucá) e *Brosimum gaudichaudii* (inharé)", protocolada sob o CEUA nº 6244160316, sob a responsabilidade de **Maria José Batista de Sousa** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Pontifícia Universidade Católica de Goiás (CEUA/PUC GOIAS) na reunião de 31/08/2016.

We certify that the proposal "Evaluation of genotoxic and mutagenic potential of standardized extracts of *Caesalpinia ferrea* (jucá) e *Brosimum gaudichaudii* (inharé)", utilizing 100 Fishes (males and females), protocol number CEUA 6244160316, under the responsibility of **Maria José Batista de Sousa** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Pontifical Catholic University of Goiás (CEUA/PUC GOIAS) in the meeting of 08/31/2016.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **05/2016** a **02/2017** Área: **Genética**

Origem: **Não aplicável biotério**

Espécie: **Peixes** sexo: **Machos e Fêmeas** idade: **60 a 90 dias** N: **100**

Linhagem: ***Astyanax* sp.** Peso: **5 a 25 g**

Resumo: O consumo de plantas medicinais é uma prática vivenciada desde a antiguidade, e vem sendo passada de geração a geração. É uma estratégia para cura e tratamento de doenças. Apesar da ampla expressividade genética vegetal, poucas espécies tem sido estudadas cientificamente em análise investigativa de suas qualidades, segurança e eficácia. Porém a importância histórica da terapêutica em suas transformações seja como fonte de alimentos, substância ativas ou mesmo na forma de medicamentos fitoterápicos, vem resistindo o passar do tempo. No entanto há necessidade de mais estudos principalmente no que se refere ao seu potencial genotóxico e mutagênico para validação da relação entre benefício e risco. E neste contexto encontra-se *Caesalpinia ferrea* e *Brosimum gaudichaudii* popularmente conhecida como jucá, pau-ferro e inharé, mama cadela respectivamente. Segundo COSTA e MENK (2000) agentes exógenos como fármaco e fitoterápicos pode gerar lesões no DNA pela ação de agentes antioxidante ou pelo mecanismo de oxirredução, pois os metabólitos pode ser reativos a bio moléculas de DNA. A pesquisa tem como finalidade avaliar a possibilidade de atividades genotóxica dos extratos hidroetanólicos das espécies em estudo, em eritrócitos de *Astyanax* sp através dos teste de micronúcleo e cometa. Ambos os testes são amplamente utilizados para detecção de danos no material genético, são de baixo custo e com boa sensibilidade, permitindo análise de danos genotóxicos e mutagênicos. Resultados destes métodos serão analisados através de testes estatísticos condizentes a 5% de significância. Perspectiva que reforce a necessidade de políticas que vise a necessidade de mais pesquisa no âmbito científico da genotoxicidade e/ou citotoxicidade dos fitoconstituintes bem como alertar a população para o uso inadequado de substância fitoterápica é prejudicial para o meio interno.

Local do experimento: Todo experimento será realizado no Núcleo de Pesquisa Replicon da Pontifícia Universidade Católica de Goiás.

Goiânia, 15 de setembro de 2016



Comissão de Ética no Uso de Animais

Marta Regina Magalhães

Profa. Dra. Marta Regina Magalhães
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Pontifícia Universidade Católica de Goiás

Profa. Dra. Graziela Torres Blanch
Vice-Coodenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Pontifícia Universidade Católica de Goiás