

**UNIVERSIDADE LUTERANA DO BRASIL
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E
TOXICOLOGIA APLICADA**



**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE GENOTÓXICA/ANTIGENOTÓXICA
DO EXTRATO VEGETAL DE *Arrabidaea chica***

*Dissertação para obtenção do Título
de Mestre em Genética e
Toxicologia Aplicada*

THAIS BASSO LONGO

Orientadora: Dra. Jaqueline Nascimento Picada

Co-orientador: Dr. Alexandre Ferraz

CANOAS

2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Este trabalho foi desenvolvido nas instalações da Ulbra Canoas/RS, nos laboratórios de Genética Toxicológica (Sala 401, prédio 19) sob a responsabilidade da Profa. Dr. Jaqueline N. Picada, Laboratório de Fitoquímica (sala 416, prédio 19) sob responsabilidade do Prof. Alexandre Ferraz, e Laboratório de Estudos Farmacocinéticos (salas 15 e 16, prédio 22) sob a responsabilidade do Prof. Dr Marc François Richter.

AGRADECIMENTOS

A professora Dra. Jaqueline N. Picada por sua orientação e apoio nestes dois anos, pela amizade e confiança, e principalmente pelas oportunidades de crescimento.

Ao professor Dr. Alexandre Ferraz pela paciência e tranquilidade com que auxiliou neste trabalho.

Ao professor Dr. Marc Richter pela colaboração nesta dissertação e a todos os professores que fizeram parte de minha formação.

Ao Dr. Amâncio Romanelli Ferreira pela colaboração nos testes e aos bolsistas e colegas do laboratório 401, Shandale, Cândida, Juliane, Vivian, Luciana, Cristiano, e os bolsistas da prof. Juliana, por toda a ajuda na realização deste trabalho e pelo carinho que sinto por vocês.

A colega e grande amiga Carmem, pois seus conselhos e incentivos desde o período de pós-graduação foram de grande importância. Te adoro.

Agradeço a Deus pela família maravilhosa e principalmente a meus pais, Henrique e Elisabeth, pelo amor e incentivo na busca e realização do mestrado. Ao meu marido, Nelson pela paciência e compreensão neste período.

Muito obrigada!

LISTA DE ABREVIATURAS

ATP – adenosina trifosfato
CAT – catalase
CLAE – cromatografia líquida de alta eficiência
CN – controle negativo
CO₂ – gás carbônico
DHBA – dihidroxi-ácido-benzóico
DMSO – dimetilsulfóxido
DNA – ácido desoxirribonucléico
EB – extrato bruto
EBO – extrato bruto oxidado
EBV – extrato bruto verde
ERO – espécies reativas de oxigênio
FA – fração aquosa
FAO – fração aquosa oxidada
FAV – fração aquosa verde
FB – fração butanólica
FBO – fração butanólica oxidada
FBV – fração clorofórmica verde
FC – fração clorofórmica
FCO – fração clorofórmica oxidada
FCV – fração clorofórmica verde
FD – frequência de dano
GPx – glutathione peroxidase
GR – glutathione reductase
GSH – glutathione reduzida
GSSG – glutathione oxidada
H₂O – água
H₂O₂ – peróxido de hidrogênio
HO• - radical hidroxil
HOCl – ácido hipocloroso
ID – índice de dano
MDA – malondialdeído
NaCl 0,9% - solução salina 0,9%
NCE – eritrócito normocromático
NO• - óxido nítrico
O₂ – oxigênio
O₂^{•-} - radical superóxido
O₂¹ – oxigênio singlet
ONOO⁻ - peroxinitrito
PBS – tampão fosfato
PCE – eritrócito policromático
RO• - radical alcóxila
ROO• - radical peróxila
SCGE – single cell gel electrophoresis
-SH – grupo tiol
SOD – superóxido dismutase
TBA – ácido tiobarbitúrico

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS.....	7
LISTA DE TABELAS.....	8
RESUMO.....	9
ABSTRACT.....	10
1 INTRODUÇÃO.....	11
1.1 A planta <i>Arrabidaea chica</i>	13
1.1.1 Aspectos taxonômicos.....	13
1.1.2 Descrição botânica.....	13
1.1.3 Constituição química de espécies do gênero <i>Arrabidaea</i>	15
1.1.4 Propriedades biológicas de espécies do gênero <i>Arrabidaea</i>	18
1.2 Estresse oxidativo e antioxidantes.....	21
1.2.1 Radicais livres.....	21
1.2.1.1 Formação de espécies reativas de oxigênio.....	22
1.2.2 Danos oxidativos ao DNA.....	25
1.2.3 Antioxidantes.....	26
1.2.3.1 Antioxidantes Enzimáticos.....	26
1.2.3.2 Antioxidantes não enzimáticos.....	28
1.3 Testes para avaliação do potencial genotóxico e antigenotóxico.....	30
1.3.1 Teste cometa.....	31
1.3.2 Teste de micronúcleo em medula óssea de camundongos.....	33
1.4 Teste para avaliação do potencial antioxidante.....	35
1.4.1 Teste hipoxantina/xantina oxidase.....	35
2 OBJETIVOS.....	37
2.1 Objetivo geral.....	37
2.2 Objetivos específicos.....	37
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	38
3.1 Material vegetal.....	38
3.2 Extração e fracionamento.....	38
3.3 Análise fitoquímica.....	39
3.3.1 Determinação de flavonóides totais.....	40
3.4 Procedimentos <i>in vitro</i>	41
3.5 Procedimentos <i>in vivo</i>	42
3.5.1 Animais experimentais.....	42
3.5.2 Tratamento dos animais.....	42
3.5.3 Amostras.....	43
3.5.4 Teste cometa.....	43
3.5.5 Teste de micronúcleos em medula óssea de camundongo.....	44
3.6 Avaliação da atividade antioxidante pelo sistema hipoxantina/xantina oxidase.....	44
3.7 Análise estatística.....	45
4 RESULTADOS.....	46

4.1 Análise fitoquímica do extrato bruto de <i>A.chica</i>.....	46
4.2 Determinação de flavonóides totais.....	46
4.3 Teste cometa <i>in vitro</i>.....	47
4.4 Teste cometa em camundongos tratados com os extratos de <i>A.chica</i>..	51
4.5 Teste de micronúcleos	56
4.6 Teste hipoxantina/xantina oxidase.....	58
5. DISCUSSÃO.....	60
6. CONCLUSÃO	66
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	68
8. PERSPECTIVAS.....	76
9. ANEXOS	77

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Partes aéreas de <i>Arrabidaea chica</i>	14
Figura 2. Antocianidinas isoladas de <i>A. chica</i>	16
Figura 3. Estrutura da Carajuflavona	16
Figura 4. Estruturas dos flavonóides de <i>A. brachypoda</i>	17
Figura 5. Estruturas das xantonas de <i>A. samydoides</i>	18
Figura 6. Reduções univalentes da molécula de oxigênio.....	23
Figura 7. Reação de Fenton	23
Figura 8. Dismutação do ânion radical superóxido catalisada pela enzima SOD	26
Figura 9. Reação da Catalase.....	27
Figura 10. Reação da glutatona reduzida e oxidada.....	28
Figura 11. Esquema para geração de espécies reativas de oxigênio no sistema hipoxantina/xantina oxidase.....	36
Figura 12. Esquema da extração e fracionamento das partes aéreas de <i>A.</i> <i>chica</i>	39
Figura 13. Inibição da geração de espécies reativas de oxigênio pela <i>A. chica</i> planta verde (V) no teste hipoxantina/xantina oxidase.....	58
Figura 14. Inibição da geração de espécies reativas de oxigênio pela <i>A. chica</i> planta oxidada (O) no teste hipoxantina/xantina oxidase.....	59
Figura 15. Avaliação da atividade da catalase em camundongos tratados por 3 dias com os extratos de <i>A. chica</i>	77
Figura 16. Avaliação da atividade da catalase em camundongos tratados por 3 dias com os extratos de <i>A. chica</i>	78
Figura 17. Avaliação da peroxidação lipídica através do TBARS em camundongos tratados por 3 dias com os extratos de <i>A. chica</i>	79
Figura 18. Avaliação da peroxidação lipídica através do TBARS em camundongos tratados por 3 dias com os extratos de <i>A. chica</i>	80
Figura 19. Esquema inibitória de camundongos tratados com extrato bruto e frações de <i>A. chica</i>	81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Análise Fitoquímica de <i>A. chica</i> das partes aéreas da planta seca verde (V) e oxidada (O).....	46
Tabela 2. Avaliação da atividade genotóxica dos extratos das partes aéreas verdes (V) de <i>A. chica</i> através do teste cometa <i>in vitro</i>	47
Tabela 3. Avaliação da atividade genotóxica dos extratos das partes aéreas oxidadas (O) de <i>A. chica</i> através do teste cometa <i>in vitro</i>	48
Tabela 4. Avaliação da atividade antigenotóxica dos extratos das partes aéreas verdes (V) de <i>A. chica</i> através do teste cometa <i>in vitro</i>	49
Tabela 5. Avaliação da atividade antigenotóxica dos extratos das partes aéreas oxidadas (O) de <i>A. chica</i> através do teste cometa <i>in vitro</i>	50
Tabela 6. Avaliação da atividade genotóxica em camundongos tratados com dose única de extratos de <i>A. chica</i>	51
Tabela 7. Avaliação da atividade genotóxica em camundongos tratados por 3 dias consecutivos com extratos de <i>A. chica</i>	52
Tabela 8. Avaliação da atividade antigenotóxica em sangue de camundongos tratados com dose única de extratos de <i>A. chica</i>	54
Tabela 9. Avaliação da atividade antigenotóxica em camundongos tratados por 3 dias consecutivos com extratos de <i>A. chica</i>	55
Tabela 10. Análise de micronúcleos de medula óssea de camundongos tratados por 3 dias consecutivos com os extratos de <i>A. chica</i>	57
Tabela 11. Teste cometa em córtex cerebral de camundongos tratados com 3 doses dos extratos de <i>A. chica</i>	82

RESUMO

A planta *Arrabidaea chica*, conhecida popularmente como cajuru, chica ou cajiru é utilizada na medicina popular como analgésica antiinflamatória, agente adstringente e para o combate de enfermidades da pele. Através do extrato bruto e frações das partes aéreas da *A. chica* foram realizados estudos fitoquímicos e a avaliação genotóxica e antigenotóxica através do teste cometa *in vitro* e *in vivo*, atividade antioxidante através do teste hipoxantina/xantina oxidase e teste de micronúcleos em medula óssea de camundongo. A análise fitoquímica da planta indicou a presença de saponinas, flavonóides, alcalóides e compostos fenólicos. Na avaliação genotóxica através do teste cometa *in vitro* o extrato bruto e frações não causaram danos ao DNA, bem como no teste cometa *in vivo* em amostras de tecidos sangüíneo e hepático de camundongos. No teste cometa *in vitro*, foram verificadas proteção contra danos ao DNA induzidos pelo peróxido de hidrogênio nos extratos bruto (EBV), fração butanólica (FBV) e clorofórmica (FCV) da planta verde e extrato bruto (EBO) e fração butanólica (FBO) da planta oxidada, enquanto que no teste *in vivo*, os tratamentos com os extratos bruto (EB) e fração clorofórmica (FC) da planta oxidada apresentaram atividade antigenotóxica. No teste hipoxantina/xantina oxidase todos os extratos, bruto e frações da planta verde e oxidada apresentaram atividade antioxidante. No teste de micronúcleos, os tratamentos realizados com extrato bruto e frações não induziram dano cromossômico nas condições testadas. O conjunto destes resultados sugere que a planta apresenta importante atividade antioxidante em testes *in vitro* (teste cometa e hipoxantina/xantina oxidase) e testes *in vivo* (teste cometa) e não apresenta efeitos genotóxicos como observado no testes cometa *in vitro* e nos testes *in vivo* (teste cometa e micronúcleos). Com base neste trabalho é importante realizar novos estudos para verificar as substâncias presentes no extrato bruto, fração butanólica e clorofórmica com atividade antigenotóxica e também na atividade antioxidante relatada em todos os extratos de *A. chica*, isolar os compostos com esta propriedade.

ABSTRACT

Arrabidaea chica plant, popularly known as cajuru, chica or cajiru in traditional medicine is used as analgesic, anti-inflammatory, astringent agent and to combat skin diseases. The crude extract and fractions of the aerial parts of the *A. chica* phytochemistry studies had been carried out and genotoxicity and antigenotoxicity evaluation through the *in vitro* and *in vivo* comet assay, antioxidant activity by hypoxanthine/xanthine oxidase assay and micronucleus assay in mouse bone marrow. The phytochemical analysis of the plant indicated the presence of saponins, flavonoids, alkaloids, and phenolic compounds. In the genotoxicity evaluation through the *in vitro* comet assay, the crude extract and fractions did not induce DNA damage, as well as in the *in vivo* comet assay in samples of blood and hepatic tissue from mice. The *in vitro* comet assay has been verified protection against DNA damage induced for hydrogen peroxide in crude extract (EBV), butanolic fraction (FBV) and cloroformic fraction (FCV) in the green plant, and crude extract (EBO) and butanolic fraction (FBO) of the oxidated plant, while *in vivo* test, the treatments with crude extract (EB) and cloroformic fraction (FC) of the oxidated plant presented antigenotoxicity activity. In the hypoxanthine/xanthine oxidase test all the extracts, crude and fractions of the green and oxidated plant showed antioxidant activity. In the micronucleus test, the treatment carried out with crude extracts and fractions did not induced chromossomic damage under the conditions tested. The set of these results suggests that the plant presents important antioxidant activity in the *in vitro* tests (comet assay and hypoxanthine/xanthine oxidase) and *in vitro* tests (comet assay) and does not present genotoxicity effects as observed in the *in vitro* comet assay and *in vivo* tests (comet assay and micronucleus test). Based on this work, it's important to carry out studies to verify the substances presents in crude extract, butanolic fraction and cloroformic fraction with antigenotoxic activity and also in the antioxidant activity mentioned in all extracts of *A. chica*, to isolate compounds with this property.

I INTRODUÇÃO

É estimado que mais de 80% da população mundial utiliza plantas medicinais como primeiro recurso para a terapêutica medicinal, no tratamento de doenças, de acordo com o conhecimento adquirido ao longo dos séculos. Entretanto as plantas medicinais podem conter xenobióticos, ou seja compostos exógenos que podem ser tóxicos e carcinogênicos. Portanto, o uso popular não é suficiente para validar as plantas medicinais como eficazes e seguras (SIMÕES *et al.*, 2000; MACIEL *et al.*, 2002).

O comércio mundial de fitoterápicos movimenta cerca de U\$ 22 bilhões de dólares anuais. Este quadro tem sido denominado “a revolução dos medicamentos fitoterápicos”. No Brasil, acredita-se que ¼ dos U\$ 8 bilhões de faturamento da indústria farmacêutica nacional em 1996 foram advindos de medicamentos fitoterápicos (YUNES *et al.*, 2001; RATES, 2001). Os estudos realizados com estes compostos, têm experimentado um crescimento acelerado, existindo uma taxa média de aumento de 10% ao ano, entretanto somente 15 a 17% das plantas existentes no mundo, têm sido estudadas sob o ponto de vista medicinal (SOEJARTO, 1996).

As plantas medicinais são popularmente utilizadas sob a forma de chá, entretanto muito pouco desses vegetais e substâncias isoladas a partir destes foram objetos de estudos quanto à mutagenicidade e genotoxicidade (FRANKE *et al.*, 2003). Poucas informações estão disponíveis a respeito do risco potencial de certas plantas para a saúde, ainda que muitas contenham substâncias químicas conhecidas por serem mutagênicas e/ou carcinogênicas (VARGAS *et al.*, 1989; ROSA *et al.*, 2007).

A legislação brasileira e internacional exige que produtos industrializados como pesticidas, agrotóxicos, fármacos e fitoterápicos entre outros, sejam produzidos ou colocados no mercado para consumo somente após a avaliação

rigorosa de suas características. A Portaria nº 116 de 8 de agosto de 1996 normatizou o estudo de toxicidade e eficácia dos produtos fitoterápicos. Os órgãos de regulamentação exigem que o produto em estudo seja submetido a uma extensa bateria de testes. Estes ensaios são realizados para determinar suas propriedades físico-químicas, atividade tóxica e neurotoxicidade em animais, e ainda seu potencial mutagênico, embrio-fetotóxico e carcinogênico. A Resolução –RE No. 90, de 16 de março de 2004 (emitida pela ANVISA) contém o chamado “Guia para a realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos”, que enfatiza a importância da avaliação toxicológica para registro ou renovação de registro de fitoterápicos (www.anvisa.gov.br). O estudo da toxicidade de plantas medicinais, bem como a determinação do potencial farmacológico é de extrema importância para a pesquisa de novos produtos naturais mais eficazes e seguros.

A flora brasileira constitui um dos maiores potenciais para a exploração de plantas medicinais (SIMÕES *et al.*, 2000) e devido a sua complexidade estima-se a existência de mais de 55.000 espécies distintas e catalogadas de plantas, de um total de 350.000, sendo que mais da metade se encontra em florestas tropicais (SOEJARTO, 1996). A região Amazônica é o local com a maior biodiversidade vegetal do Brasil, sendo que muitas plantas são desconhecidas pelos cientistas, entretanto há muitos anos são utilizadas pelos índios na cura de doenças (SILVA *et al.*, 2007).

1.1 A planta *Arrabidaea chica*

1.1.1 Aspectos taxonômicos

Arrabidaea chica pertence à família Bignoniaceae (sin: *Bignonia chica* (Bonpl.)) que consiste em aproximadamente 120 gêneros e 800 espécies de plantas arbustivas, arbóreas e trepadeiras. As espécies deste táxon encontram-se distribuídas nas regiões tropicais de todo o mundo, com ocorrência freqüente em regiões tropicais da América do Sul e África, sendo muito comum na região Amazônica do Brasil. Algumas destas espécies são cultivadas como ornamentais, devido à beleza de suas florações, os jacarandás (*Jacaranda brasiliana*) e ipês amarelo e roxo (*Tabebuia alba* e *T. avellanedae*) são exemplos mais representativos da família. Plantas desta família são muito utilizadas na construção civil, carpintaria e construção de instrumentos musicais devido à natureza rígida da madeira. No Brasil ocorrem desde a Amazônia até o Rio Grande do Sul, não possuindo *habitat* único, podem ser encontradas nos Cerrados, Mata Atlântica e região Amazônica (TAKEMURA *et al.*, 1995; POSER *et al.*, 2000; BITTENCOURT *et al.*, 2003; PAULETTI *et al.*, 2003a; PAULETTI *et al.*, 2003b).

1.1.2 Descrição botânica de *A. chica*

A. chica é descrita como uma trepadeira com ramos angulosos. Apresenta folhas opostas, trifoliadas ou bifoliadas, terminando em gavinhas^a simples (Figura 1A). Os folíolos são coriáceos, oblongos ou ovado-lanceolados, acuminados com 6 cm de comprimento e seu cálice é campanulado-tubuloso. Sendo a corola campanulada de cor roxa violácea ou purpúrea. As flores medem cerca de 3,5 a 4 cm de comprimento e são dispostas em panículas^b de 18 a 20 cm de comprimento (Figura 1B e 1C). Constitui-se de silíqua^c comprida e glabra^d com 15 a 18 cm de comprimento a 1 a 1,5 cm de largura (SCHNEIDER e LONDERO, 1965; REITZ, 1974).

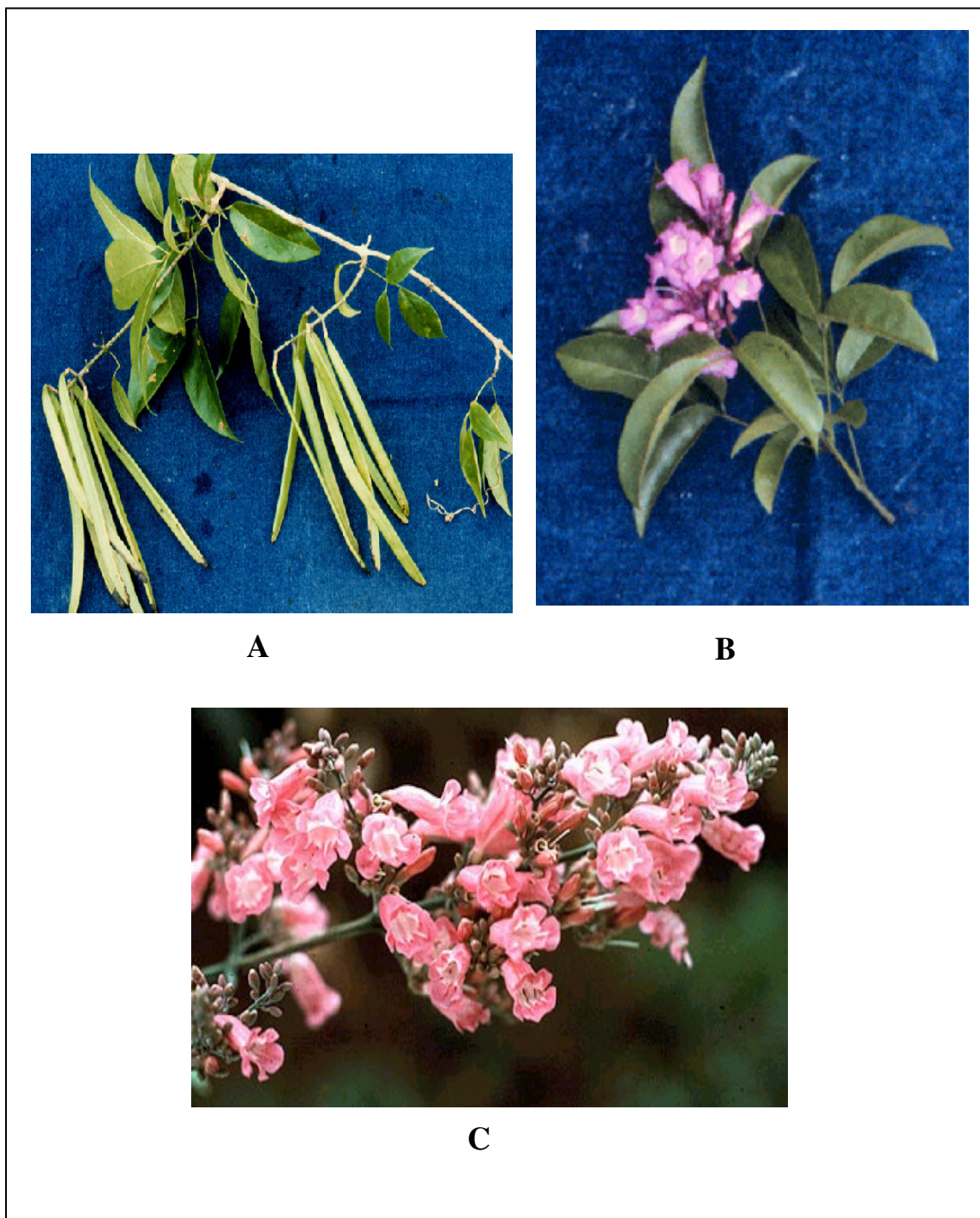


Figura 1. Partes aéreas de *Arrabidaea chica*. (A) Folhas, (B) Flores e folhas e (C) Flores.

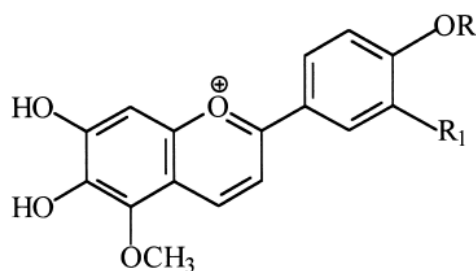
^aGavinha: órgão de fixação de certas plantas, que se enrola em estacas ou outras plantas; ^bPanículas: cacho de flores, de pedúnculos ramificados, assumindo formato de cone; ^cSilíqua: Fruto deiscente, formado por duas valvas alongadas que abrigam uma membrana mediana com sementes nas bordas; ^dGlabra: sem pêlos.

1.1.3 Constituição química de espécies do gênero *Arrabidaea*

Com base na literatura científica, verifica-se que existem poucos relatos de estudos químicos do gênero *Arrabidaea*, sendo *A. chica* a espécie mais estudada. A partir desta espécie foram isolados fitoesteróis (TAKEMURA, 1993), taninos e principalmente flavonóides (TAKEMURA *et al.*, 1995; ALCERITO *et al.*, 2002; PAULETTI *et al.*, 2003a; PAULETTI *et al.*, 2003b).

Chapman *et al.* (1927), identificaram a 3-desoxiantocianidina, o primeiro composto de *A. chica* sendo denominada carajurina. Posteriormente, os trabalhos de Harborne (1967) e Scogin (1980) verificaram que a ocorrência deste raro pigmento vegetal em Bignoniaceae era restrito a espécie *A. chica* (ZORN *et al.*, 2001).

Em estudo realizado por Zorn *et al.* (2001) a partir do extrato éter etílico das folhas de *A. chica* foram isoladas e identificadas quatro antocianidinas (Figura 2). Deste extrato os compostos foram isolados por cromatografia em coluna sendo o composto 1 (carajurina) de estrutura já conhecida por Ponniah e Seshadri (1953) e os compostos 2 a 4 de estrutura inédita que são; 2 (carajurona), 3 (6,7,3',4'-tetraidroxi-5-metóxi-flavilium) e 4 (6,7,3'-triidroxi-5-4'-dimetóxi-flavilium) (Figura 2). Também em estudo de Devia *et al.* (2002) foram isolados os compostos descritos acima com exceção do composto 4, das folhas de *A. chica*.



1: R = CH₃, R₁ = H

2: R, R₁ = H

3: R = H, R₁ = OH

4: R = CH₃, R₁ = OH

Figura 2. Antocianidinas isoladas de *A.chica* (ZORN *et al.*, 2001).

A carajuflavona (Figura 3) (6,7,3',4'-tetraidroxi-5-metóxi-5-flavona), pertencente a classe das flavonas foi obtida por cromatografia em coluna a partir da fração acetato de etila do extrato metanólico das folhas de *A. chica*. (TAKEMURA *et al.*, 1995).

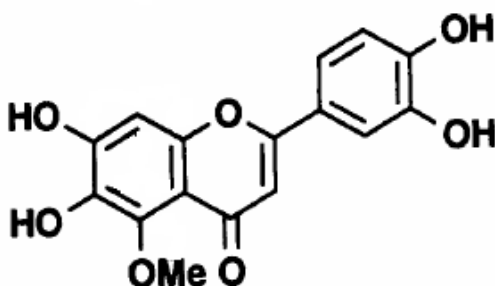
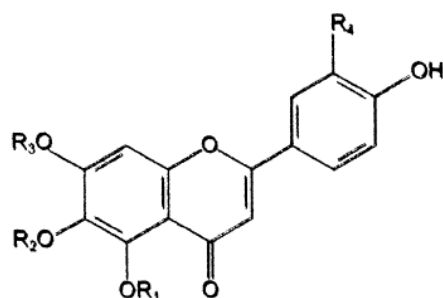


Figura 3. Estrutura da carajuflavona (TAKEMURA *et al.*, 1995).

Outro trabalho que relata a presença desta classe de metabólitos secundários foi realizado por Alcerito *et al.* (2002). Neste estudo foram isolados do extrato clorofórmico das folhas (cera epicuticular) de *Arrabidaea brachypoda* 4 flavonas, sendo inédito o composto 3'-4'-diidroxi-5,6,7-trimetóxi-5-flavona (Figura 4 – composto 1) e já conhecidos os compostos cirsimarina(3),

hispidulina (4) e cirsilol (2) (Figura 4) onde este último composto foi encontrado pela primeira vez na família Bignoniaceae.



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
1	CH ₃	CH ₃	CH ₃	OH
2	H	CH ₃	CH ₃	OH
3	H	CH ₃	CH ₃	H
4	H	CH ₃	H	H

Figura 4. Estruturas dos flavonóides de *A. brachypoda* (ALCERITO *et al.*, 2002).

A partir do caule de *Arrabidaea samydoides* na fração clorofórmica foram isolados por cromatografia em coluna os compostos, lupeol, sitosterol, estigmasterol e crisina. Ainda com esta planta, foi isolado o composto 3 β ,16 α -diidroxiolean-12-eno, utilizando o mesmo método cromatográfico da fração hexânica dos caules, e em outra fração clorofórmica das folhas, foram obtidos os compostos, eritrodiool, uvaol e ácido ursólico (PAULETTI *et al.*, 2003a).

Em outro estudo realizado por Pauletti *et al.* (2003b) a partir do caule de *A. samydoides* no extrato etanólico foram isolados por cromatografia 3 xantonas de estrutura inédita, C-glucopiranosilxantona-2(2'-O-trans-cafeoil)-C- β -D-glucopiranosil-1,3,6,7-tetraidroxixantona (Figura 5 -1); 2-(2'-O-trans-cinamoil)-C- β -D-glucopiranosil-1,3,6,7-tetraidroxixantona (2) e o composto 2-(2'-O-trans-coumaroil) C- β -D-glucopiranosil - 1,3,6,7-tetraidroxixantona (3).

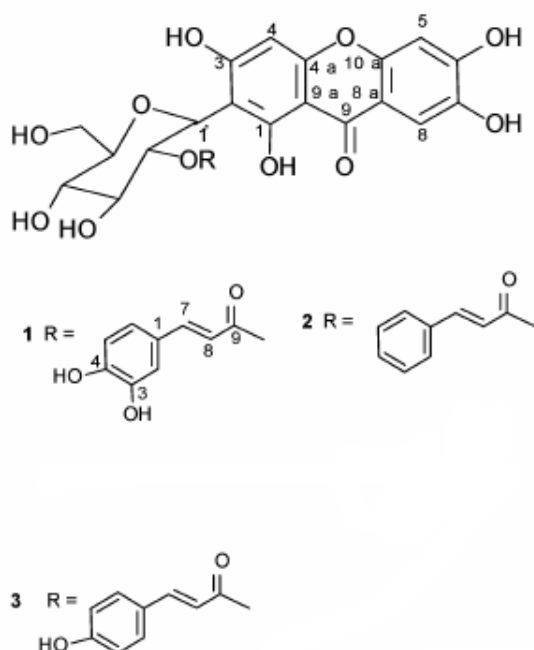


Figura 5. Estruturas das xantonas de *A. samydooides* (PAULETTI *et al.*, 2003).

O desenvolvimento do estudo bioguiado que verificou atividade contra *Trypanosoma cruzi* levou ao isolamento por cromatografia dos triterpenos, ácido oleanólico e ácido ursólico isolados do extrato etanólico das folhas de *Arrabidaea triplinervia* (LEITE *et al.*, 2006).

1.1.4 Propriedades biológicas de espécies do gênero *Arrabidaea*

Espécies do gênero *Arrabidaea* são muito utilizadas na medicina popular na assepsia de ferimentos e tratamento de distúrbios intestinais (PAULETTI *et al.*, 2003b). A planta *Arrabidaea chica* (sin: *Bignonia chica* (Bonpl.)), (Figura 1) popularmente chamado no Brasil de carajuru, chica, pariri ou cajiru, é amplamente utilizada na medicina caseira, principalmente na região Amazônica, apesar de ocorrer em quase todo o Brasil (REITZ, 1974; TAKEMURA *et al.*, 1995; ZORN *et al.*, 2001). Suas folhas apresentam atividades analgésica, antiinflamatória e adstringente (SILVA *et al.*, 2007),

sendo utilizada em cólicas intestinais, diarreia sanguinolenta, leucorréia, anemia e leucemia. Também é utilizada topicamente para combater as enfermidades da pele (TAKEMURA *et al.*, 1995; ZORN *et al.*, 2001).

As folhas de *A. chica* (Figura 1A) quando submetidas à fermentação fornecem um corante vermelho-escuro ou vermelho tijolo (vermelho carajuru), insolúvel na água e solúvel no álcool e no óleo (REITZ, 1974). Uma das substâncias presentes neste corante avermelhado foi identificada como 3-desoxiantocianidinas chamada de Carajurina (6,7-dihidroxi-5,4'-dimetoxi-flavilium) (ZORN *et al.*, 2001; PAULETTI *et al.*, 2003a). No norte do Brasil, o corante das folhas é utilizado em tatuagens pelos índios (PAULETTI *et al.*, 2003b). Alguns estudos como de Magalhães (UNICAMP), avaliam a possibilidade do desenvolvimento do batom de *A. chica*. O pigmento vermelho produzido por esta planta é estável, possuindo vantagens sobre corantes como o urucum, pelo fato de resistir à degradação, sendo potencialmente interessante para compor formulações de cosméticos em geral (www.inova.unicamp.br). Outro estudo da planta *A. chica* realizado por Barata *et al.* (UNICAMP) avalia a possibilidade do emprego de *A. chica* na forma de extrato fitoterápico para o emprego como antifúngico e antibacteriano (www.inova.unicamp.br).

As antocianidinas, classe de compostos que estão presentes em *A. chica*, corresponde a um grande grupo de pigmentos como vermelho, púrpura e azul nas flores e frutas, sendo muito utilizado em corantes de alimentos (AZEVEDO *et al.*, 2007). Recentemente foi demonstrado por Pool-Zobel *et al.* (1999) que algumas antocianidinas têm potencial antioxidante *in vitro*. Outros dois estudos por Wang *et al.* (1999) e Azevedo *et al.* (2007) indicam que os compostos coloridos, as antocianidinas, podem ser responsáveis pela proteção contra radicais peróxil.

No estudo de outras plantas do gênero *Arrabidaea*, observou-se atividade contra *Trypanosoma cruzi* da planta *Arrabidaea triplinervia*. A partir do

extrato etanólico das folhas dois triterpenos foram isolados, o ácido oleanólico e ácido ursólico, apresentando atividade contra a doença de Chagas (LEITE *et al.*, 2006).

Em outro estudo realizado por Pauletti *et al.* (2003b) foi avaliada uma possível atividade antioxidante contra o composto 1,1-difenil-2-picrilidrazil (DPPH). A partir do extrato etanólico do caule de *A. samydoides* foram isolados por cromatografia 3 xantonas. Destas, apresentaram atividade antioxidante a C-glucopiranosilxantona-2(2'-O-trans-cafeoil)-C-β-D-glucopiranosil-1,3,6,7 tetraidroxixantona e o composto 2-(2'-O-trans-coumaroil)C-β-D-glucopiranosil-1,3,6,7-tetraidroxixantona e moderada atividade antioxidante o composto 2-(2'-O-trans-cinamoil)-C-β-D-glucopiranosil -1,3,6,7-tetraidroxixantona.

A planta *Arrabidaea brachypoda* é nativa do Cerrado brasileiro, sendo conhecida popularmente cipó-una ou "tintureiro" e possui corante rosa presente nas flores. Quatro flavonas do extrato clorofórmico das folhas de *A. brachypoda* foram isoladas no estudo de Alcerito *et al.* (2002), e estas foram testadas quanto à atividade antifúngica em *Cladosporium sphaerospermum*. Dentre as flavonas isoladas, apresentaram atividade antifúngica a 3'-4'-diidroxil-5,6,7-trimetóxilflavona, a cirsimaritina e o cirsilol, enquanto o composto hispidulina não obteve resposta.

Outra planta do gênero *Arrabidaea* testada quanto às atividades antimicrobiana e antifúngica é a *Arrabidaea bilabiata*. No estudo de González *et al.* (2000) os extratos metanólico e isopropanol foram testados *in vitro* contra os microrganismos *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus sp* para a verificação da atividade antimicrobiana e contra *Candida albicans* para a atividade antifúngica. Os resultados deste estudo mostraram que ambos extratos apresentam possível atividade antifúngica, não apresentando o mesmo efeito na atividade antimicrobiana.

1.2 Estresse oxidativo e antioxidantes

1.2.1 Radicais livres

Os radicais livres são espécies químicas naturais, pois são produzidos continuamente nos organismos vivos (AUGUSTO, 2006), apresentando funções biológicas como, auxiliar o sistema imunológico no combate a infecções, participar da sinalização celular e principalmente da apoptose e necrose (SEIFRIED *et al.*, 2007). Por outro lado, são considerados nocivos pois participam direta ou indiretamente de uma série de doenças. De acordo com a velocidade de produção e a capacidade de desintoxicação do organismo, os radicais livres tanto podem colaborar na destruição de vasos patogênicos durante a resposta imunológica celular, como participar de doenças, principalmente, inflamação, doenças vasculares e doenças neurodegenerativas (AUGUSTO, 2006).

O metabolismo do oxigênio também gera uma série de subprodutos reativos e potencialmente tóxicos, os radicais livres de oxigênio (AUGUSTO, 2006). Um radical livre é uma espécie química (átomo ou molécula) que possui um elétron desemparelhado no seu orbital de valência (n° ímpar de elétrons). Isto confere ao radical uma alta reatividade química pela tendência de adquirir o segundo elétron para estabilizar o seu orbital de valência (KARIHTALA e SOINI, 2007). Os radicais livres mais importantes incluem os radicais hidroxil HO^\bullet , ânion superóxido $\text{O}_2^{\bullet-}$, óxido nítrico NO^\bullet , alcoxila RO^\bullet , peroxila ROO^\bullet e peroxinitrito ONOO^- . O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o ácido hipocloroso (HOCl) não são radicais livres mas estão envolvidos na geração de radicais livres no organismo. O termo espécies reativas de oxigênio (ERO) tem sido utilizado por incluir todas essas espécies que contêm oxigênio (OSAWA, 1994; GARCEZ *et al.*, 2004; AUGUSTO, 2006).

As ERO podem alterar a estrutura de proteínas, danificar processos enzimáticos e membranas lipídicas (peroxidação lipídica) e provocar danos ao DNA (HWANG e KIM, 2007). Estudos sugerem que as ERO participam do mecanismo fisiopatológico de várias doenças humanas, entre elas doença de Parkinson, esclerose múltipla, distrofia muscular, catarata, retinopatias, aterosclerose, infarto do miocárdio, síndrome isquêmica e reperfusão, enfisema pulmonar, cirrose hepática, artrite reumatóide e vários tipos de câncer (SEIFRIED *et al.*, 2007). Também nos transplantes de órgãos e doenças decorrentes da radiação, do fumo e da poluição e no processo de envelhecimento as ERO desempenham um papel importante (OSAWA, 1994; GARCEZ *et al.*, 2004; AUGUSTO, 2006).

Numerosos mecanismos de defesas celulares existem para prevenir a ação das ERO, protegendo os organismos vivos contra danos oxidativos. Estes sistemas incluem superóxido dismutase e catalase que remove o $O_2^{\bullet-}$ e o H_2O_2 do citoplasma, respectivamente; a glutathione peroxidase e glutathione, que reduz H_2O_2 para H_2O ; as vitaminas E e C, que funcionam para o término da reação da cadeia lipídica envolvendo radicais peroxil (GARCEZ *et al.*, 2004; AUGUSTO, 2006; HWANG e KIM, 2007).

1.2.1.1 Formação das espécies reativas de oxigênio

As ERO são geradas principalmente pela mitocôndria na cadeia respiratória (BROZMANOVÁ *et al.*, 2001). O oxigênio molecular participa, por exemplo, da combustão total da glicose da qual resulta a produção de CO_2 , H_2O e energia química na forma de adenosina trifosfato (ATP) (BOVERIS, 1998). A redução do oxigênio molecular à água é feita por transferência de elétrons na cadeia respiratória, realizada em quatro etapas. Em cada etapa a redução dá origem a um tipo de espécie respectivamente, o ânion superóxido, o peróxido de hidrogênio e o radical hidroxil (Figura 6) (SEIFRIED *et al.*, 2007). Cerca de 2-5% do oxigênio consumido pela mitocôndria é transformado em ERO (BOVERIS, 1998).

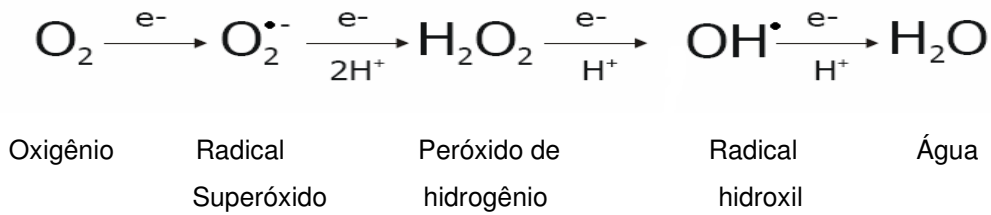


Figura 6. Reduções univalentes da molécula de oxigênio (DA SILVA, 2003).

A primeira etapa é a redução do elétron produzindo radical $\text{O}_2^{\bullet-}$. Em metabolismo aeróbico 1-2% do consumo total de oxigênio resulta em produção de superóxido. No entanto $\text{O}_2^{\bullet-}$ é relativamente pouco reativo e tóxico, mas ele gera produtos secundários, como H_2O_2 . Esta reação ocorre espontaneamente, ou é catalisada pela enzima superóxido dismutase (SOD). O H_2O_2 sozinho não é tóxico, mas é altamente reativo quando e *in vivo* participa da Reação de Fenton (Figura 7) (BROZMANOVÁ *et al.*, 2001). O H_2O_2 é um agente oxidante fraco, porém pode tornar inativas enzimas por oxidação dos grupos tiol (-SH) essenciais (GARCEZ *et al.*, 2004). Em contraste com o H_2O_2 , o radical HO^\bullet é extremamente reativo podendo induzir danos diretos ao DNA, proteínas, lipídios e carboidratos, sendo considerada a ERO que mais ocasiona danos (MARNETT, 2000; BROZMANOVÁ *et al.*, 2001; HWANG e KIM, 2007).



Figura 7. Reação de Fenton

Oxigênio singlet (O_2^1) é um radical capaz de modificar o DNA diretamente e pode ser gerado pelos fagócitos, por indução luminosa, por reações catalisadas por peroxidases e outras. O O_2^1 difere do oxigênio (O_2) no estado molecular porque não apresenta restrição na transferência de elétrons, sendo altamente reativo. O O_2^1 causa dano às proteínas devido a oxidação de grupos essenciais de aminoácidos, sendo também responsável por dar início a

peroxidação lipídica, produzindo radicais RO^\bullet e ROO^\bullet (GARCEZ *et al.*, 2004; KARIHTALA e SOINI, 2007).

Além das mitocôndrias, outras organelas geram ERO, como no retículo endoplasmático liso durante o metabolismo de compostos endógenos e a biotransformação de xenobióticos, nos peroxissomos que contêm muitas enzimas que geram H_2O_2 , tais como glicolato oxidase, urato oxidase e as flavoproteínas (SEIFRIED *et al.*, 2007). As ERO também podem ser geradas através da auto-oxidação de pequenas moléculas (hidroquinonas, catecolaminas), produzindo ânion superóxido e na ação bactericida dos neutrófilos e fagócitos, produzindo o radical superóxido, onde cerca de 70 a 90% do oxigênio consumido por estas células formam o ânion superóxido (BOVERIS, 1998).

Muitos agentes exógenos tóxicos como radiação ionizante (raios X e δ), radiação não ionizante, poluição ambiental e produtos tóxicos são potenciais geradores de ERO. Aproximadamente 60-70% dos danos celulares são produzidos por radiação ionizante formando radicais HO^\bullet (BROZMANOVÁ *et al.*, 2001).

O radical livre NO (óxido nítrico) é produzido nos macrófagos e contribui para a morte de bactérias e células tumorais. Este pode se combinar com o radical $O_2^{\bullet-}$, formando o $ONOO^-$, que se compara ao radical HO^\bullet em relação à reatividade (BROZMANOVÁ *et al.*, 2001; GARCEZ *et al.*, 2004).

1.2.2 Danos oxidativos ao DNA

A produção excessiva de radicais livres ou a diminuição da atividade antioxidante pode provocar um desequilíbrio que é denominado estresse oxidativo. Este distúrbio pode provocar dano celular, oxidação de biomoléculas, incluindo danos ao DNA e proteínas (OSAWA, 1994; HWANG e KIM, 2007).

As proteínas, incluindo enzimas de reparo de DNA e DNA polimerases são os alvos mais freqüentes das ERO. Estas espécies reativas podem danificar proteínas direta ou indiretamente através da peroxidação lipídica, levando ao desequilíbrio celular (KARIHTALA e SOINI, 2007).

Danos ao DNA produzidos pela oxidação são considerados muito mais freqüentes. É estimado que aproximadamente 2×10^4 lesões oxidativas ao DNA ocorrem no genoma humano por dia. O reparo destas lesões tem importante papel na manutenção dos organismos. Muitas evidências sugerem que o dano cumulativo ao DNA é causado pelas ERO contribuindo para numerosas doenças. Os danos oxidativos podem contribuir para o declínio das funções normais do organismo, aumentando o risco de doenças como câncer, aterosclerose, síndromes auto-imunes entre outras (BROZMANOVÁ *et al*, 2001).

O peróxido de hidrogênio é capaz de passar livremente por difusão na membrana celular (BARBOUTI *et al.*, 2001). Os alvos da ação do H_2O_2 são proteínas quinases e fosfatases, proteínas contendo grupos sulfidril, lipídios, DNA entre outros alvos. O DNA celular é especialmente sensível à ação do H_2O_2 , onde a indução do dano é mediada por íons metálicos como ferro e cobre através da reação de Fenton para formação do radical HO^\bullet (Figura 7) (KARIHTALA e SOINI, 2007). Após geração do radical HO^\bullet , que é extremamente reativo, ocorrem danos ao DNA que incluem modificações de

bases nitrogenadas, quebras simples e duplas de cadeia e trocas entre cromátides irmãs (BARBOUTI *et al.*, 2001).

1.2.3 Antioxidantes

Antioxidante é definido como qualquer agente que em baixas concentrações retarda ou inibe a velocidade de oxidação de uma substância oxidável (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2000).

Os danos induzidos pelo estresse oxidativo podem ser minimizados pelo sistema de defesa antioxidante não-enzimático e/ou sistema de defesa antioxidante enzimático, este representado pelas enzimas superóxido dismutase (SOD), Catalase (CAT), glutaciona-peroxidase (GPx) e glutaciona redutase (GR) (BORELLA e VARELA, 2004; HWANG e KIM, 2007; KARIHTALA e SOINI, 2007).

1.2.3.1 Antioxidantes enzimáticos

A SOD foi descoberta em 1969 por McCord e Fridovich. Ela é responsável pela dismutação do radical superóxido a peróxido de hidrogênio, que é menos reativo e pode ser degradado por outras enzimas, como a CAT ou GPx (LLESUY, 2002; BORELLA e VARELA, 2004; AUGUSTO, 2006). A SOD é capaz de aumentar em mil vezes a dismutação do ânion radical superóxido como mostra a figura 8 (AUGUSTO, 2006).

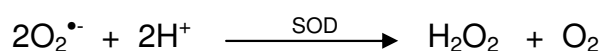


Figura 8. Dismutação do ânion radical superóxido catalisada pela enzima SOD (BORELLA e VARELA, 2004).

Os mamíferos possuem três tipos de SOD diferentes, todas capazes de eliminar eficientemente o ânion radical superóxido. A SOD 1 é encontrada no citosol e espaço intermembranas da mitocôndria; a SOD 2, na matriz mitocondrial e a SOD 3 no espaço extracelular (BORELLA e VARELA, 2004; AUGUSTO, 2006; KARIHTALA e SOINI, 2007).

A enzima CAT é uma ferrihemoenzima cuja função principal é dismutar peróxido de hidrogênio formando água e oxigênio molecular, conforme a figura 9 (FRIDOVICH, 1998; ENGELHARDT, 1999).



Figura 9. Reação da Catalase (FRIDOVICH, 1998)

Em animais, a CAT está presente em quase todos os órgãos, principalmente o fígado. A atividade da CAT em homogenizados de tecidos é originária da ruptura dos peroxissomos durante a homogeneização (KARIHTALA e SOINI, 2007). Por não possuírem peroxissomos, alguns órgãos estão mais expostos aos danos provocados pela produção de ERO, como coração, pulmões e cérebro (LLESUY, 2002; BORELLA e VARELA, 2004).

As peroxidases são enzimas que utilizam uma variedade de redutores celulares para inativar peróxidos. Além de agir sobre o peróxido de hidrogênio, também neutralizam peróxidos orgânicos, como alquil-hidro-peróxidos (ENGELHARDT, 1999; BORELLA e VARELA, 2004; AUGUSTO, 2006). A GPx é uma selenoenzima (utiliza selênio como co-fator), cuja ação é baseada na oxidação da GSH ao dissulfeto correspondente (GSSG). A razão entre glutathiona reduzida e oxidada (GSH/GSSG) é alta, necessitando reduzir novamente GSSG à GSH, processo realizado pela enzima glutathiona-redutase (GR) como mostra a Figura 10 (ENGELHARDT, 1999; LLESUY, 2002; BORELLA e VARELA, 2004; AUGUSTO, 2006; KARIHTALA e SOINI, 2007).

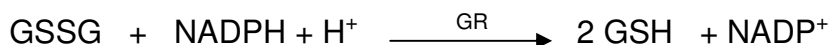
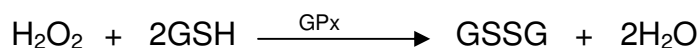


Figura 10. Reações da glutatona reduzida e oxidada (BORELLA e VARELA, 2004).

1.2.3.2 Antioxidantes não-enzimáticos

Além das defesas antioxidantes enzimáticas, possuem grande relevância os antioxidantes não-enzimáticos, como as vitaminas E e C (HWANG e KIM, 2007) e os compostos polifenólicos (SPADA e DA SILVA, 2004).

Dentre as vitaminas, as que apresentam comprovado efeito antioxidante estão, a vitamina C ou ácido ascórbico, o β -caroteno e a vitamina E (AUGUSTO, 2006). Inúmeros estudos têm indicado que a vitamina A pode agir como antioxidante ou pró-oxidante. Sob pressões normais de oxigênio o β -caroteno, precursor da vitamina A, age como antioxidante e em pressões altas passa a exercer efeito pró-oxidante. A vitamina C é um antioxidante doador de elétrons e, portanto um agente redutor. A vitamina E designa todos os tocoferóis varredores de radicais peroxil, que são, provavelmente, os inibidores mais importantes na reação em cadeia da peroxidação lipídica em animais (SPADA e DA SILVA, 2004).

Os polifenóis são compostos com um ou mais anéis aromáticos, carregando grupos hidroxilas, sendo portanto, capazes de quelar metais e varrer radicais livres pela formação de radicais fenoxil. Outros polifenóis com as proantocianidinas produzem pigmentos avermelhados da classe das antocianidinas, com alto potencial antioxidante (SANTOS e MELLO, 2000). A atividade farmacológica dos taninos está relacionada à complexação com íons

metálicos, sendo seqüestradores de radicais livres, além de complexar com outras moléculas (HASLAM, 1996; SANTOS e MELLO, 2000; SPADA e DA SILVA, 2004).

Os flavonóides presentes nas plantas possuem atividade antioxidante, devido a sua estrutura polifenólica, de propriedade química redutora, que confere a capacidade seqüestradora de radicais livres como o ânion superóxido, o radical hidroxil ou peroxil (RICE-EVANS, 1995; RICE-EVANS *et al.*, 1996, 1997; RICE-EVANS, 2001). Também podem apresentar como mecanismo antioxidante a habilidade de estabilizar as membranas (HARBORNE e WILLIAMS, 2000).

Muitos fenóis inibem a peroxidação lipídica, atuando como seqüestradores do radical peroxil. Apresentam também atividade regeneradora de outros antioxidantes, estabilizadora de oxigênio singlete e quelante de metais (WEI *et al.*, 2005).

1.3 Testes para avaliação do potencial genotóxico e antígenotóxico

A exposição a agentes genotóxicos em nosso ambiente pode causar uma variedade de efeitos sobre a saúde humana. Estes efeitos podem se expressar imediatamente ou de forma tardia, como câncer ou doenças genéticas nas gerações seguintes (LEMOS e TERRA, 2003).

Nos anos 50 e 60 a ecologia e a genética se uniram e desenvolveram os primeiros testes rápidos e eficientes hoje empregados em genotoxicidade. A maioria dos testes genéticos busca agentes que possam afetar o genoma. Devido à universalidade do código genético, se um agente pode causar danos ao DNA têm potencial genotóxico em qualquer tipo de célula. Porém diferentes organismos possuem metabolismo, mecanismos de reparação e de detoxificação que variam tornando as respostas a agentes genotóxicos diferentes (VILLELA *et al.*, 2003).

A avaliação do potencial genotóxico (ou mutagênico) de um agente químico isolado é realizada utilizando estudos que abrangem organismos procarióticos e eucarióticos, com testes *in vitro* e *in vivo*. Os primeiros estudos devem ser, preferencialmente, estudos realizados *in vitro*, e conforme os resultados obtidos, são então recomendados ensaios mais específicos *in vitro* e *in vivo* (VILLELA *et al.*, 2003).

Muitos pesquisadores baseiam-se em técnicas de avaliação da genotoxicidade para investigar o potencial antígenotóxico de antioxidantes. Alguns antioxidantes protegem o DNA contra danos induzidos pelo H₂O₂, como no teste cometa *ex vivo* (SZETO *et al.*, 2002). Este procedimento permite verificar efeito antígenotóxico por mecanismos antioxidantes de proteção contra danos oxidativos ao DNA (SZETO *et al.*, 2002; PEREIRA *et al.*, 2005).

1.3.1 Teste cometa

O teste Cometa ou *Single-Cell Gel Electrophoresis* (SCGE) vem sendo proposto para estudos de toxicogenética devido a suas peculiaridades e vantagens quando comparado a outros testes para detecção de substâncias genotóxicas. Diferente das mutações, as lesões detectadas pelo teste são passíveis de correção. Assim sendo, o teste cometa pode ser utilizado para estudos do reparo do DNA, trazendo informações importantes sobre a cinética e o tipo de lesão reparada, embora não possibilite interferir na fidedignidade do processo de reparo. O teste cometa é uma metodologia que permite a detecção de danos e seu reparo em uma única célula e conseqüentemente, em determinada subpopulação celular (HARTMANN *et al.*, 2003; RIBEIRO *et al.*, 2003; RUNDELL *et al.*, 2003; WIKLUND e AGURELL, 2003).

A técnica foi primeiramente introduzida por Singh *et al.* (1988) e vem sendo largamente utilizada na indústria em testes de genotoxicidade *in vitro* (HARTMANN *et al.*, 2003), para detectar agentes suspeitos de induzir danos ao DNA. Existem algumas limitações para o teste cometa *in vitro* como tempo de exposição e o uso de ativação metabólica (como S9 mix) entre outras restrições dos testes de genética toxicológica *in vitro* (TICE *et al.*, 2000). O sistema de ativação metabólica no teste *in vitro*, não expressa as mesmas condições do teste *in vivo*, pois algumas enzimas específicas do citocromo P450 não estão presentes (TWEATS *et al.*, 2007).

Um aspecto importante no teste cometa é a possibilidade de realização do teste em órgãos, tecidos e populações celulares específicas tanto em condições *in vitro* quanto *in vivo* (WITTE *et al.*, 2007). O resultado positivo *in vivo* é indicativo de genotoxicidade da substância teste no órgão ou tecido e ganha significância após verificação inicial do teste *in vitro* (SCHWAAB *et al.*, 2005).

A grande vantagem do teste cometa *in vivo*, é a possibilidade de verificar a atividade genotóxica de substâncias com a influência de fatores farmacocinéticos como a absorção, distribuição, metabolização e excreção. Desta forma muitos testes que apresentam resultado positivo *in vitro*, não expressam o mesmo resultado *in vivo*, provavelmente devido a estes fatores (SCHWAAB *et al.*, 2005).

Para avaliação do efeito genotóxico diretamente no órgão ou tecido alvo do agente em estudo, o teste cometa foi incorporado à bateria de testes de genotoxicidade *in vivo* (HARTMANN *et al.*, 2003; HARTMANN *et al.*, 2004). Sasaki *et al.* (2002) testaram 208 produtos químicos em oito diferentes órgãos de camundongos e demonstraram a eficácia do teste cometa na avaliação da genotoxicidade *in vivo* e na identificação dos tecidos alvo para tumores daqueles produtos.

A versão alcalina do teste cometa, utilizada neste trabalho, detecta quebras de fita simples e dupla, sítios alcali-lábeis e *crosslinks*. A metodologia do teste consiste inicialmente na disposição de uma suspensão de células embebidas em gel de agarose sobre a superfície de uma lâmina de microscopia. Em seguida, as lâminas são transferidas para uma solução com alta concentração de sais e detergentes a fim de lisar as células, removendo o seu conteúdo citoplasmático e membrana nuclear. Posteriormente, as lâminas são imersas em um tampão de pH 13 (alcalino). O processo faz o desenovelamento das cadeias de DNA, pelo rompimento das estruturas secundária e terciária. Após esta etapa, as lâminas são submetidas à eletroforese de modo a induzir a migração dos fragmentos de DNA. As lâminas são coradas com nitrato de prata (TICE *et al.*, 2000; DUEZ *et al.*, 2003; HARTMANN *et al.*, 2003; VILLELA *et al.*, 2003; WITTE *et al.*, 2007).

Para interpretação dos resultados, o “cometa” é dividido em duas partes: “cabeça” e “cauda”. Assim, células sem ou com pouco dano no DNA não apresentariam cauda, enquanto células com mais danos apresentariam caudas

maiores. O tamanho e intensidade, aspecto e outras características dos cometas são mensurados visualmente por microscopia ou por programas específicos de análise de imagem (TICE *et al.*, 2000; RIBEIRO *et al.*, 2003).

Numa versão modificada do teste, as células ou tecidos de indivíduos tratados com a substância teste, antes de serem colocados em solução de lise, são tratadas com agente genotóxico, por exemplo, o peróxido de hidrogênio (SZETO *et al.*, 2002). Este método, denominado, teste cometa *ex vivo*, é utilizado na determinação da antigenotoxicidade de substâncias com potencial antioxidante, que podem proteger as células dos efeitos genotóxicos induzidos por lesões oxidativas ao DNA.

O teste cometa pode vir a integrar as baterias de testes *in vivo/ in vitro* usadas para fins de regulamentação de produtos químicos (TICE *et al.*, 2000; RIBEIRO *et al.*, 2003; VILLELA *et al.*, 2003; WITTE *et al.*, 2007).

1.3.2 Teste de micronúcleo em medula óssea de camundongos

O teste de micronúcleo em medula óssea de camundongos faz parte dos testes recomendados pelas agências internacionais e instituições governamentais para avaliação e registro de novos produtos químicos e farmacêuticos (CHOY, 2001; RIBEIRO *et al.*, 2003).

Micronúcleos (MN) são pequenos corpúsculos similares em estrutura ao núcleo e formados por material cromossômico. Este material cromossômico é perdido durante a mitose, decorrente de quebras ou problemas de fuso. Após separação das cromátides no processo mitótico dois núcleos são reconstituídos, um em cada pólo. A membrana nuclear é refeita ao redor destes dois conjuntos de cromossomos. Mas se um cromossomo inteiro ou um fragmento cromossômico acêntrico não se integra ao novo núcleo (por não

estar unido ao fuso), este constitui um pequeno núcleo, chamado de micronúcleo (DA SILVA *et al.*, 2003; FENECH, 2005).

A frequência de micronúcleos pode aumentar em consequência de danos genéticos causados por agentes físicos, químicos ou biológicos, capazes de interferir no processo de ligação do cromossomo às fibras do fuso, ou que possam induzir a perda de material genético (DA SILVA *et al.*, 2003).

Os eritrócitos, células abundantes na medula óssea e sangue periférico de mamíferos, são utilizados no teste por sua alta rotatividade, ausência de núcleo e possibilidade de diferenciar eritrócitos jovens pela presença de RNA. Os eritrócitos jovens, denominados eritrócitos policromáticos (EPC) contém RNA ribossomal e diferenciam-se pela coloração com corante para ácidos nucléicos, como por exemplo o Giemsa. Os EPCs permanecem estáveis por 24 horas após a expulsão do núcleo, nas células dos mamíferos, enquanto que os eritrócitos maduros, que são denominados de eritrócitos normocromáticos (ENC), apresentam coloração homogênea por conter somente hemoglobina (DA SILVA *et al.*, 2003; VILELLA *et al.*, 2003).

1.4 Teste para avaliação do potencial antioxidante

1.4.1 Teste hipoxantina/xantina oxidase

O teste fundamenta-se no processo de hidroxilação da hipoxantina, que é transformada em xantina e depois em ácido úrico (devido à presença da enzima xantina oxidase). A hipoxantina/xantina oxidase produz também o íon superóxido a partir do oxigênio e peróxido de hidrogênio a partir da água. Na presença de Fe^{+3} e EDTA, o íon superóxido reduz o Fe^{+3} para formar Fe^{+2} , que forma, numa segunda etapa, o peróxido de hidrogênio e o radical hidroxila, que são muito reativos. A metodologia para determinar a concentração deste radical hidroxila no teste é baseada na reação dos radicais hidroxilas com o ácido salicílico. Desta forma são formados dois compostos estáveis: 2,3 e 2,5 dihidroxi-ácido-benzóico (2,3-DHBA e 2,5-DHBA) (Figura 11), que podem ser medidos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (OWEN *et al.*, 1996; OWEN *et al.*, 2000).

A presença de antioxidantes pode influenciar na produção dos dois compostos estáveis 2,3-DHBA e 2,5 DHBA, pois pode ocorrer competição entre o antioxidante e o ácido salicílico na reação com radicais livres (radicais hidroxila). Sendo assim, formará menos radicais hidroxila que podem reagir com ácido salicílico, portanto terá menos compostos formados (2,3 DHBA e 2,5 DHBA). Quanto menos esses compostos forem formados, maior a atividade antioxidante do composto testado (MOURA *et al.*, 2007).

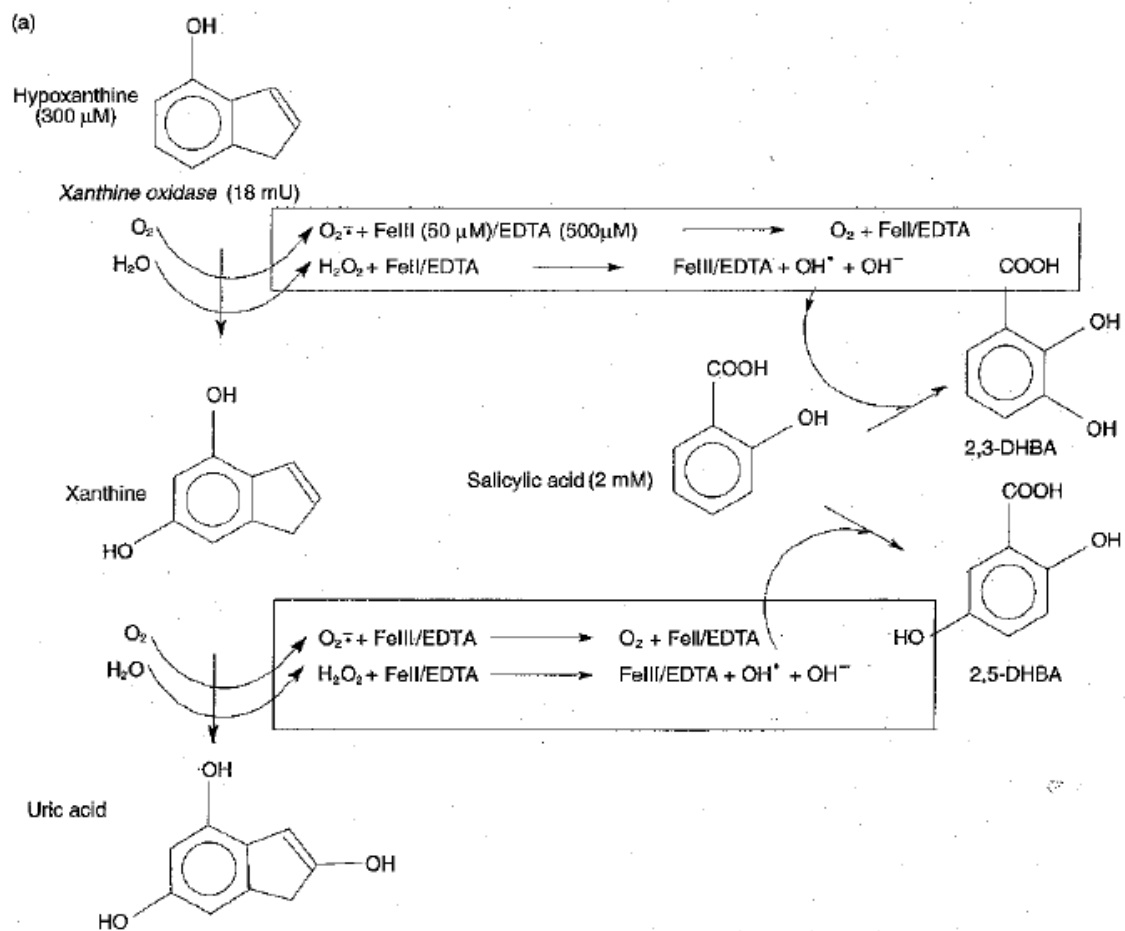


Figura 11. Esquema para geração de espécies reativas de oxigênio no sistema hipoxantina/xantina oxidase (OWEN *et al.*, 2000).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial mutagênico, genotóxico/antigenotóxico e antioxidante do extrato e frações das partes aéreas da planta *Arrabidaea chica*.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a presença dos principais grupos de metabólitos secundários (alcalóides, antraquinonas, cardiotônicos, cumarinas, flavonóides, taninos, saponinas) presentes em *A. chica*.

- Avaliar a atividade genotóxica do extrato bruto e frações (clorofórmica, butanólica e água) de *A. chica*, através do teste cometa *in vitro* em sangue periférico de ratos.

- Avaliar a atividade antigenotóxica do extrato bruto e frações de *A. chica*, através do teste cometa *in vitro* em sangue periférico de ratos, utilizando peróxido de hidrogênio como agente indutor de danos ao DNA.

- Avaliar a atividade genotóxica do extrato bruto e frações de *A. chica*, através do teste cometa em camundongos.

- Avaliar a atividade antigenotóxica do extrato bruto e frações de *A. chica* em camundongos, através do teste cometa *ex vivo*, utilizando peróxido de hidrogênio como agente indutor de danos ao DNA.

- Avaliar a atividade mutagênica do extrato bruto e frações de *A. chica*, através do teste de micronúcleos em medula óssea de camundongo.

- Avaliar o potencial antioxidante do extrato bruto e frações através do teste *in vitro* hipoxantina/xantina oxidase.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Material vegetal

As partes aéreas de *A. chica* (Bignoniaceae) foram coletadas no verão no município de Taquari no Estado do Rio Grande do Sul. Uma amostra foi identificada pelo botânico e realizada uma exsicata, sendo depositada no Herbário da Ulbra. O material, imediatamente após a coleta, foi selecionado, e seco em ambiente arejado e ao abrigo de luz direta e triturado em moinhos de facas. O material foi dividido em planta seca verde (as folhas após secagem permanecem verdes) e a outra parte, a planta oxidada (folhas com coloração avermelhada). Após separação foi realizada a extração e fracionamento dos extratos. A planta verde somente foi utilizada para os testes cometa *in vitro* e Hipoxantina/xantina oxidase, não sendo utilizada nos testes *in vivo* devido à oxidação do material. Sendo que a planta oxidada foi utilizada para os demais testes incluindo os citados anteriormente (Figura 12).

3.2 Extração e fracionamento

Para extração dos constituintes químicos (figura 12), as partes aéreas (100 gramas) da espécie em estudo, foram submetidas à decocção em água destilada (1000ml), obtendo-se o extrato bruto, onde parte deste extrato foi submetido à secura no aparelho de rotavapor e denominado extrato bruto (EB). A seguir, utilizando o restante da solução do EB, foi realizada a partição utilizando solventes em polaridade crescente (clorofórmica, butanólica e água). Os extratos obtidos foram concentrados à secura em aparelho de rotavapor e denominados, fração clorofórmica (FC), fração butanólica (FB) e fração aquosa (FA). Para administração nos animais os extratos secos foram diluídos posteriormente em solução salina 0,9%.

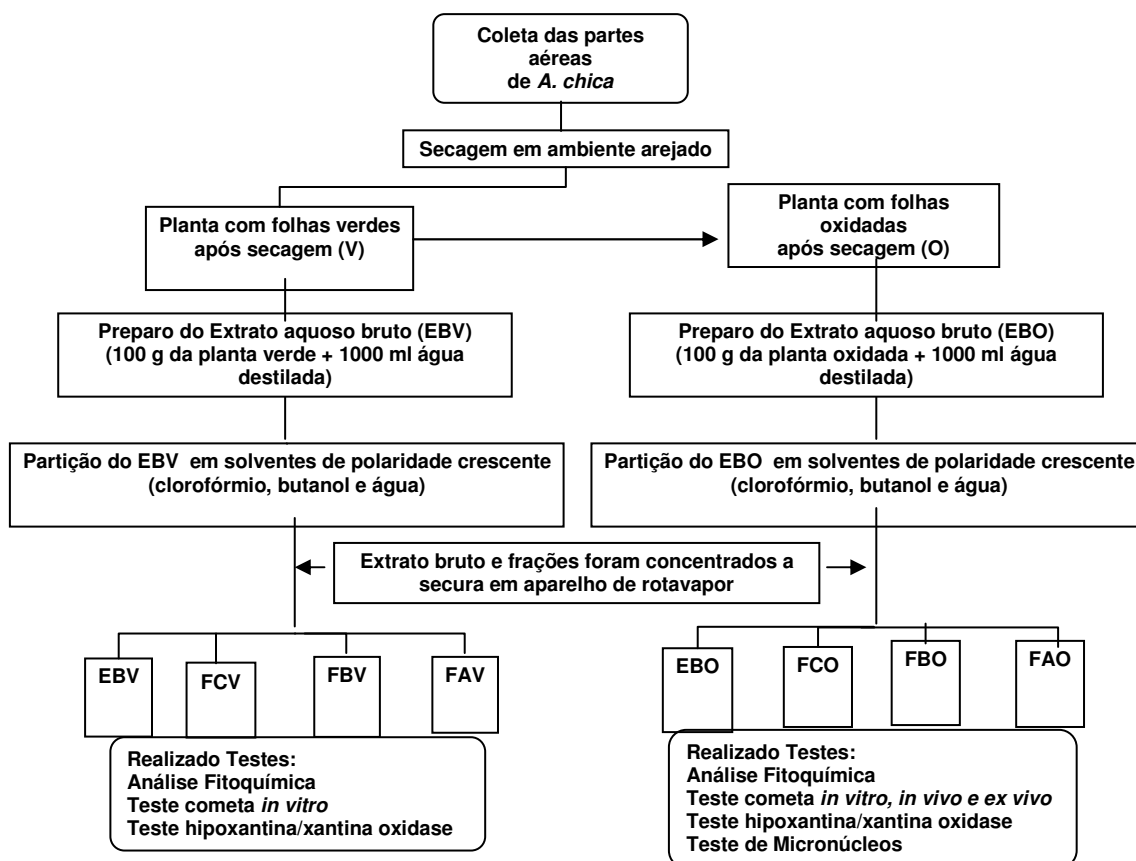


Figura 12. Esquema da extração e fracionamento das partes aéreas de *A. chica*.

3.3 Análise fitoquímica

Os estudos fitoquímicos foram realizados visando caracterizar os grupos químicos presentes na espécie vegetal trabalhada, de acordo com a metodologia proposta por HARBORNE (1998).

Para esta análise verificou-se a ocorrência dos seguintes grupos químicos através dos respectivos ensaios: alcalóides (Mayer, Bertrand e Dragendorff); antraquinonas (reação de Borntraeger); cardiotônicos (Salkowsky, Keller-Killiane, Baljet); cumarinas (teste de fluorescência em papel alcalinizado); compostos fenólicos (cloreto férrico); taninos (teste da gelatina); flavonóides (reação de cianidina) e saponinas (teste da espuma).

3.3.1 Determinação de flavonóides totais

Para a determinação de Flavonóides determinou-se a perda por dessecação da *A.chica*, sendo que 2 g de planta moída foram colocadas em pesa-filtro chato, previamente pesado e dessecado na estufa por 5 horas. A amostra da planta foi colocada na estufa a 100°C e permaneceu por mais 5 horas, retirando a tampa do pesa-filtro e deixando-a dentro da estufa. Retirou-se o pesa-filtro com a amostra deixando esfriar dentro do dessecador. Após resfriamento pesou-se o pesa-filtro com a amostra. A porcentagem de perda por dessecação foi calculada pela equação:

$$Pd = \frac{Pu - Ps}{Pa} \times 100$$

Onde: Pd: Perda por dessecação

Pa: peso da amostra

Pu: peso do pesa-filtro contendo a amostra antes da dessecação.

Ps: peso do pesa-filtro contendo a amostra após a dessecação.

Após a determinação de perda por dessecação, necessária para cálculo de determinação de flavonóides totais, foi realizado o teste, conforme Farmacopéia Brasileira IV onde preparou-se a solução-mãe, a solução amostra e a solução branca. A absorvância destas soluções foi medida em espectrofotômetro em 425nm após 30 minutos do seu preparo utilizando a solução branca para ajuste do zero. O teor de flavonóides totais foi calculado segundo a expressão:

$$Q = \frac{A \times 62500}{500 \times m \times (100 - Pd)}$$

Em que: A: absorvância média

m: massa do vegetal (g)

Pd: perda por dessecação

3.4 Procedimentos *in vitro*

Para o teste cometa *in vitro*, foram utilizadas 3 diferentes concentrações de cada extrato. As concentrações foram de: 5 mg/ml, 7,5 mg/ml e 10 mg/ml. Sendo 10 mg/ml a concentração máxima para solubilizar os extratos. O solvente dos extratos foi a solução de PBS (tampão fosfato, pH 7,4), utilizada também como controle negativo. Para o controle positivo utilizou-se peróxido de hidrogênio (0,20 mM) por 5 minutos a 4°C.

Cada extrato nas três concentrações e os controles negativos foram incubados por uma hora a 37°C com 200 microlitros de amostra de sangue de roedor.

3.5 Procedimentos *in vivo*

3.5.1 Animais experimentais

Foram utilizados camundongos CF-1 machos e fêmeas com idade de 8 semanas e peso médio de 40 g, oriundos do Biotério da Universidade Luterana do Brasil, ULBRA, Canoas, RS. Os animais foram mantidos a 22°C, com ciclo claro 12h/escuro 12h, durante todo o período experimental, com alimentação e água a vontade.

3.5.2 Tratamento dos animais

Os animais foram tratados conforme o grupo por 3 dias. Para cada grupo de tratamento foram utilizados 10 animais, sendo 5 machos e 5 fêmeas. Os grupos foram: Controle Negativo: solução salina (NaCl 0,9%); Extrato bruto de *A. chica* na dose de 2000 mg/Kg/dia; Extrato bruto de *A. chica* na dose de 1000 mg/Kg/dia; Extrato bruto de *A. chica* na dose de 500 mg/Kg/dia; Fração butanólica de *A. chica* na dose de 1000 mg/Kg/dia; Fração clorofórmica de *A. chica* na dose de 1000 mg/Kg/dia; Fração aquosa de *A. chica* na dose de 1000 mg/Kg/dia e Controle positivo (Teste de Micronúcleos): Ciclofosfamida 20 mg/Kg/dia administrados no segundo e terceiro dia de tratamento por via

intraperitoneal. As administrações foram feitas pela via oral (gavagem) e ajustadas ao peso de cada animal sendo de 0,1ml/10g de peso do camundongo.

3.5.3 Amostras

Para o teste cometa em camundongos foram coletadas amostras de sangue total da cauda dos animais 3h e 24h através de uma pequena incisão na veia caudal. O sangue foi colocado em tubos tipo Eppendorf contendo heparina (12 μ L para cada 50 μ L de sangue total). Após o final do tratamento no 4º dia, os animais foram sacrificados por decapitação onde amostras de sangue e fígado foram coletadas para o teste cometa.

Foram utilizadas amostras de medula óssea dos animais, a partir dos fêmures, para análise de micronúcleos.

3.5.4 Teste cometa

Utilizou-se a versão alcalina (pH>13) do teste cometa *in vitro*, *in vivo* e *ex vivo* como descrito em Tice et al. (2000). Após incubação, uma alíquota de 5 microlitros foi misturada com 95 microlitros de agarose "low melting" 0,75% e a mistura foi colocada sobre lâminas pré-cobertas com agarose normal a 1,5%. Para avaliação da atividade antígeno-tóxica (teste cometa *ex vivo*), as lâminas foram tratadas com solução de peróxido de hidrogênio 0,20 mM em PBS, por 5 minutos a 4°C, e após lavadas três vezes com NaCl 0,9%, procedimento descrito por Pereira *et al.* (2005). Após essas etapas, todas as lâminas foram mergulhadas em uma solução de lise (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA e 10 mM Tris, pH 10 com adição de 1% Triton X-100 e 10% DMSO na hora do uso), por no mínimo 1 hora até no máximo 72 horas a 4°C, para o rompimento das membranas celulares. Posteriormente, as lâminas foram incubadas em tampão alcalino (300 mM NaOH e 1 mM EDTA, pH > 13) por 20 minutos para permitir a desnaturação do DNA. E após este período foi realizada a eletroforese com aplicação de corrente elétrica de 300 mA e 25 V (0,90 V/cm) por 15 minutos. As

lâminas foram neutralizadas com tampão Tris 0,4 M, pH 7,5, coradas com nitrato de prata, conforme descrito em Nadin *et al.* (2001) e analisadas ao microscópio ótico.

Os resultados foram expressos em índice de danos (ID) e frequência de danos (FD). O ID foi obtido pela avaliação visual das classes de dano (de 0, sem dano aparente a 4, com máximo dano), em cem células analisadas por tratamento. Foram classificados como sendo de classe zero os núcleos intactos, que apareceram redondos. Já nas células lesadas, o DNA livre que migrou do núcleo em direção ao ânodo, durante a eletroforese, foi visualizado como uma “cauda” de fragmentos sedimentados, semelhante a um cometa e foram classificadas em classes 1 (dano mínimo) a 4 (dano máximo). Assim o ID pode variar de 0 (todas as células da classe zero: 0×100) a 400 (todas as células com classe quatro: 4×100). FD foi calculada baseada no número de células com dano *versus* aquelas sem dano (TICE *et al.*, 2000; NADIN *et al.*, 2001; HARTMANN *et al.*, 2003).

Os resultados para avaliação do potencial antigenotóxico foram expressos conforme Kapiszewska *et al.* (2005) através dos percentuais de inibição do índice de dano (ID) de acordo com a expressão: (I%): porcentagem de inibição do ID = $[\text{ID do H}_2\text{O}_2 - \text{ID do extrato com H}_2\text{O}_2] / [\text{ID do H}_2\text{O}_2 - \text{ID do controle negativo}] \times 100$.

3.5.5 Teste de micronúcleos em medula óssea de camundongo

Utilizou-se o procedimento padrão, descrito em Mavournin *et al.* (1990) e Miller *et al.* (1997). Após o sacrifício dos animais, amostras da medula óssea foram coletadas de ambos os fêmures. O fêmur foi retirado e limpo com auxílio de tesoura e pinça de dissecação, e papel toalha absorvente áspero. A extremidade final proximal do fêmur foi cortada para expor o canal da medula. Uma agulha histológica foi inserida firmemente na abertura do fêmur, para possibilitar que a medula fosse extraída e misturada a uma gota de soro fetal bovino previamente colocado sobre uma das extremidades de uma lâmina de

microscopia codificada. Com auxílio de uma espátula curva, a amostra foi homogeneizada no soro, obtendo-se uma suspensão de células. Foi realizado o esfregaço da suspensão celular sobre a lâmina com auxílio de uma outra lâmina inclinada num ângulo de 45°. Foram preparadas duas lâminas por animal. Após a secagem da preparação por aproximadamente 30 min, as lâminas foram tratadas com metanol em temperatura ambiente por 10 min para fixação do material biológico. E após secagem por 30 min, foi realizada a coloração utilizando corante de Giemsa (Merck) em tampão fosfato 0,2 M, pH 5,8 (proporção de 1:9). Após 7 minutos nesta solução de coloração, as lâminas foram enxaguadas em água destilada, secas e guardadas em caixas de lâminas até a análise. Para a contagem dos eritrócitos normocromáticos (ENC), eritrócitos policromáticos (EPC) e micronúcleos em EPCs utilizou-se microscópio ótico com objetiva de imersão. Pelo menos 2000 EPC foram analisados por animal. A relação EPC/ENC também foi determinada pela avaliação da frequência de EPC em 2000 eritrócitos de cada animal.

3.6 Avaliação da atividade antioxidante pelo sistema hipoxantina/xantina oxidase

O ensaio foi realizado através da incubação de hipoxantina, da enzima xantina oxidase, na presença de Fe^{+3} , EDTA e de ácido salicílico, em banho-maria a 37°C durante 3 horas, na presença dos extratos de *A.chica* em 5 concentrações: 0,1 mg/ml, 0,25 mg/ml, 0,5 mg/ml, 1 mg/ml e 2 mg/ml. Após incubação, 30 µL de cada amostra foram utilizados para análise via HPLC. Foi aplicado um gradiente à base dos solventes água/ácido acético (96:4) e metanol, com fluxo de 1 ml/min durante 22 minutos.

Foi utilizada a coluna de fase reversa µbondapack C18 (300x3, 9mm - 4µm) da empresa Waters e um equipamento de CLAE Alliance (Waters), constituído pelo módulo de separação 2695 (Waters) com autosampler e um detector UV-VIS 2487 dualis λ (Waters). A detecção do 2,3- DHBA e do 2,5- DHBA foi feita em 325 nm. Em paralelo foi medido num comprimento de onda de 278 nm para monitorar e analisar a quantidade de ácido úrico, o que mostra se a enzima estava ou não funcionando.

3.7 Análise estatística

A análise estatística para o teste cometa foi conduzida utilizando análise de variância (ANOVA) com o teste Post Hoc de Dunnett. São considerados genotóxicos os tratamentos que aumentam significativamente o ID ou FD em relação ao tratamento com o controle negativo, com valores de $P \leq 0,05$ e antígenotóxicos os tratamentos que diminuem significativamente os danos induzidos pelo peróxido de hidrogênio, com valores de $P \leq 0,05$ e de forma dose-dependente.

Para o teste de micronúcleos, os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) com o teste Post Hoc de Dunnett. São considerados mutagênicos os tratamentos que aumentam a frequência de micronúcleos em relação ao tratamento com o controle negativo, com valores de $P \leq 0,05$, e de forma dose-dependente.

Para o teste hipoxantina/xantina oxidase os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) com o teste de Tukey. Os dados foram expressos em média \pm desvio padrão (DP), sendo considerados significativos valores de $P \leq 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Análise fitoquímica do extrato bruto de *Arrabidaea chica*

A análise fitoquímica das partes aéreas da planta seca verde e planta seca oxidada (Tabela 1) sugere a presença de saponinas, alcalóides, flavonóides, compostos fenólicos, além de ausência de cumarinas, taninos, antraquinonas e compostos cardiotônicos.

Tabela 1. Análise fitoquímica de *A. chica* das partes aéreas da planta seca verde e oxidada.

Compostos	Planta verde	Planta oxidada
Cumarinas	-	-
Saponinas	+	+
Alcalóides	+	+
Flavonóides	+	+
Taninos	-	-
Compostos fenólicos	+	+
Cardiotônicos	-	-
Antraquinonas	-	-

4.2 Determinação de flavonóides totais

Inicialmente, para análise do teor de flavonóides totais, determinou-se a perda por dessecação das folhas secas oxidadas (1,25g) de *A.chica* em 9,215%. Posteriormente, a partir deste valor, e conforme a técnica descrita na Farmacopéia IV edição, quantificou-se espectrofotometricamente a concentração de flavonóides totais em 1,82% de quercetina.

4.3 Teste cometa *in vitro*

Para o teste cometa *in vitro*, não foi verificado dano ao DNA em células sangüíneas tratadas com o extrato bruto e as frações obtidas a partir das partes aéreas secas verdes (V) de *A. chica* (Tabela 2). Porém, na planta oxidada (O), o extrato bruto (EBO) (Tabela 3), na concentração de 10 mg/ml, apresentou um aumento significativo no ID e FD ($p < 0,01$). Resultados similares foram obtidos com a fração aquosa oxidada (FAO) nas concentrações de 5 e 7,5 mg/ml, apresentando aumento de ID e FD, quando comparada ao controle negativo. Para as demais frações, butanólica oxidada (FBO) e clorofórmica oxidada (FCO) (Tabela 3), não foram verificados aumentos no ID e FD.

Tabela 2. Avaliação da atividade genotóxica dos extratos das partes aéreas verdes (V) de *A. chica* através do teste cometa *in vitro*

	EBV ^a	FAV ^b	FBV ^c	FCV ^d
Concentração (mg/ml)	Índice de dano			
CN	3,2±0,5	4,2±2,1	16,5±7,0	31,0±8,3
5	5,0±4,4	8,5±5,2	12,2±5,0	20,0±4,2
7,5	8,0±2,0	5,2±5,7	19,7±7,5	25,7±8,8
10	6,5±5,2	10,5±3,0	16,0±4,7	31,2±3,8
	Freqüência de dano			
CN	1,2±0,5	3,2±1,5	5,5±1,0	11,7±7,6
5	1,7±1,5	4,0±1,1	4,7±1,2	6,2±1,9
7,5	2,5±0,6	4,2±4,6	7,2±2,2	9,5±5,1
10	2,2±1,5	4,7±0,5	7,0±4,1	12,0±3,2

^aEBV (extrato bruto verde); ^bFAV (fração aquosa verde); ^cFBV (fração butanólica verde); ^dFCV (fração clorofórmica verde);

Resultados expressos em - média ± desvio padrão.

Índice de dano – de zero (sem dano, 100 células X 0) a 400 (com máximo de dano, 100 X 4).

Freqüência de dano – calculada baseada no número de células com dano versus aquelas sem dano.

CN: controle negativo: solvente dos extratos (PBS).

Tabela 3. Avaliação da atividade genotóxica dos extratos das partes aéreas oxidadas (O) de *A. chica* através do teste cometa *in vitro*

	EBO ^a	FAO ^b	FBO ^c	FCO ^d
Concentração (mg/ml)	Índice de dano – ID			
CN	6,0±7,3	6,0±7,3	24,7±13,6	21,5±3,3
5	6,5±2,6	29,0±14,8**	25,0±5,6	43,0±21,6
7,5	9,0±6,3	17,2±7,1**	25,2±7,4	37,0±13,9
10	33,7±12,3**	3,5±5,7	14,3±5,0	30,0±9,3
	Freqüência de dano – FD			
CN	4,2±6,6	4,2±6,6	12,7±8,9	7,2±0,5
5	2,2±1,2	5,7±3,8*	14,5±3,5	18,0±6,2
7,5	5,7±3,8	4,5±1,7*	10,0±3,4	14,7±12,8
10	27,0±18,2**	1,2±1,5	6,3±1,1	9,75±4,6

^aEBO (extrato bruto oxidado); ^bFAO (fração aquosa oxidada); ^cFBO (fração butanólica oxidada); ^dFCO (fração clorofórmica oxidada);

Resultados expressos em - média ± desvio padrão.

Índice de dano – de zero (sem dano, 100 células X 0) a 400 (com máximo de dano, 100 X 4).

Freqüência de dano – calculada baseada no número de células com dano versus aquelas sem dano.

CN: controle negativo: solvente dos extratos (PBS).

*p≤0,05 ; **p≤0,01

Para avaliar a atividade antígenotóxica *in vitro*, foi realizado o tratamento com peróxido de hidrogênio 0,20 mM, após incubação dos extratos com sangue total. Os resultados da avaliação antígenotóxica indicaram que o extrato bruto obtido da planta verde (EBV) protegeu o DNA, na maior concentração testada (10 mg/ml), contra danos oxidativos induzidos pelo H₂O₂. Este efeito foi mais pronunciado nas frações butanólica (FBV) e clorofórmica (FCV), com a diminuição do ID e FD, em comparação ao controle positivo, nas 3 concentrações (Tabela 4). Porém a fração aquosa (FAV) não apresentou atividade antígenotóxica. Resultados similares foram obtidos a partir da planta oxidada (Tabela 5). O extrato bruto (EBO), bem como a fração butanólica (FBO), mas não a fração clorofórmica (FCO), diminuíram ID e FD nas três concentrações, indicando efeito protetor contra danos oxidativos ao DNA. A fração aquosa (FAO) novamente não apresentou efeito (Tabela 5).

A porcentagem de inibição do ID (I%) foi superior a 50 % em todos os extratos mencionados acima, sendo na planta verde (Tabela 4) de 82,2% para

EBV, e chegando a 94,7% para FBV e 74,8% para FCV. Em relação a planta oxidada (Tabela 5), EBO apresentou redução do ID de 99%, enquanto FBO alcançou o valor de 78,2%, demonstrando com mais este parâmetro, que estes extratos apresentam potencial antígeno-tóxico *in vitro*.

Tabela 4. Avaliação da atividade antígeno-tóxica dos extratos das partes aéreas verdes (V) de *A. chica* através do teste cometa *in vitro*

	EBV ^a	FAV ^b	FBV ^c	FCV ^d
Conc. (mg/ml)	Índice de dano – ID			
CN	3,2±0,5	4,2±2,1	16,5±7,0	31,0±8,3
CP	199,5±34,5	217,2±29,2	223,0±16,5	321,0±32,5
5	197,5±54,6	190±20,0	27,5±11,3 ^{**} (94,7%) ^e	104,0±18,4 [*] (74,8%) ^e
7,5	147,7±35,9	265,7±33,5	27,3±14,6 ^{**} (94,8%) ^e	131,0±21,8 [*] (65,5%) ^e
10	38,2±9,9 ^{**} (82,2%) ^e	235,7±59,9	45,5±11,7 ^{**} (86%) ^e	110,0±51,7 [*] (72,8%) ^e
	Frequência de dano – FD			
CN	1,20±0,5	3,2±1,5	5,5±1,0	11,7±7,6
CP	67,5±10,6	77,7±4,5	72,7±2,9	90,5±6,8
5	75,0±15,8	77,5±15	14,0±5,9 ^{**}	48,5±6,4 [*]
7,5	57,2±10,3	85,7±9,1	14,3±7,5 ^{**}	45,7±13,7 [*]
10	18,5±7,8 ^{**}	72,5±11,3	20,2±7,8 ^{**}	44,5±19,4 [*]

^aEBV (extrato bruto V); ^bFAV (fração aquosa V); ^cFBV (fração butanólica V); ^dFCV (fração clorofórmica V);

Resultados expressos em - média ± desvio padrão.

^eI%: porcentagem de inibição do ID = [ID do H₂O₂ – ID do extrato com H₂O₂] / [ID do H₂O₂ – ID do controle negativo] x 100.

Índice de dano – de zero (sem dano, 100 células X 0) a 400 (com máximo de dano, 100 X 4).

Frequência de dano – calculada baseada no número de células com dano versus aquelas sem dano.

CN: controle negativo: solvente dos extratos (PBS).

CP: controle positivo: H₂O₂ (0,20 mM).

*p≤0,05 ; **p≤0,01

Tabela 5. Avaliação da atividade antigenotóxica dos extratos das partes aéreas oxidadas (O) de *A. chica* através do teste cometa *in vitro*

	EBO ^a	FAO ^b	FBO ^c	FCO ^d
Conc. (mg/ml)	Índice de dano			
CN	6,0±7,3	6,0±7,3	24,7±13,6	21,5±3,3
CP	331,7±40,3	345,7±32,1	296,0±70,2	242,0±21,1
5	9,0±6,3**(99%) ^e	291,2±43,8	95,0±54,6*(74,1%) ^e	291,7±76,9
7,5	33,7±12,3**(91,5%) ^e	326,2±42,9	32,5±27,8**(97,1%) ^e	319,5±64,2
10	89,2±22,6*(75,5%) ^e	320,2±33,9	84,0±27*(78,2%) ^e	243,7±56,8
	Frequência de dano			
CN	4,2±6,6	4,2±6,6	12,7±8,9	7,2±0,5
CP	93,7±2,4	87,2±8,8	89,7±11,6	65,2±4,4
5	5,7±3,8**	71,7±13,8	35,0±13,8*	80,5±11,1
7,5	27,0±18,1**	83,2±10,6	14,5±17,1**	85,5±13,8
10	42,7±12,2*	82,5±7,9	41,3±14,6*	82,0±7,6

^aEBO (extrato bruto O); ^bFAO (fração aquosa O); ^cFBO (fração butanólica O); ^dFCO (fração clorofórmica O);

Resultados expressos em - média ± desvio padrão.

^e!%: porcentagem de inibição do ID = [ID do H₂O₂ – ID do extrato com H₂O₂] / [ID do H₂O₂ – ID do controle negativo] x 100.

Índice de dano – de zero (sem dano, 100 células X 0) a 400 (com máximo de dano, 100 X 4).

Frequência de dano – calculada baseada no número de células com dano versus aquelas sem dano.

CN: controle negativo: solvente dos extratos (PBS).

CP: controle positivo: H₂O₂ (0,20 mM)

*p≤0,05 ; **p≤0,01

4.4 Teste cometa em camundongos tratados com os extratos de *A. chica*

Para o teste cometa *in vivo*, somente foram utilizadas as partes aéreas oxidadas de *A. chica*. Os animais (machos e fêmeas) foram tratados por via oral (gavagem) com o extrato bruto e frações da planta. Após 3h e 24h da primeira dose, foram coletados amostras de sangue para avaliação genotóxica. Como mostra a tabela 6, o extrato bruto e frações de *A. chica* não induziram danos ao DNA em nenhum dos grupos experimentais.

Tabela 6. Avaliação da atividade genotóxica em camundongos tratados com dose única de extratos de *A. chica*.

ÍNDICE DE DANOS GRUPOS	SANGUE 3 HORAS		SANGUE 24 HORAS	
	MACHOS	FÊMEAS	MACHOS	FÊMEAS
CONTROLE EB ^a	6,4 ± 6,5	9,0 ± 6,8	17,2 ± 6,3	6,3 ± 5,9
EB 500 ^b	7,3 ± 5,9	12,3 ± 7,6	18,5 ± 8,9	4,9 ± 5,2
EB 1000 ^c	4,6 ± 3,9	5,7 ± 4,9	15,3 ± 9,7	13,2 ± 15,9
EB 2000 ^d	6,5 ± 4,9	8,7 ± 9,7	19,2 ± 14,1	10,8 ± 13,3
CONTROLE FR ^a	11,1 ± 8,5	2,0 ± 3,1	29,2 ± 20,2	3,7 ± 6,1
FB 1000 ^e	6,9 ± 9,1	6,9 ± 4,4	23,8 ± 9,9	6,5 ± 10,8
FC 1000 ^f	4,7 ± 5,3	7,4 ± 6,5	22,0 ± 15,4	8,2 ± 6,3
FA 1000 ^g	8,6 ± 6,8	3,2 ± 4,9	16,0 ± 9,5	3,2 ± 4,9
FREQÜÊNCIA DE DANOS				
GRUPOS				
CONTROLE EB ^a	6,1 ± 6,3	5,6 ± 3,4	9,9 ± 4,0	4,4 ± 3,7
EB 500 ^b	5,8 ± 4,9	6,0 ± 3,1	14,0 ± 9,1	4,0 ± 3,6
EB 1000 ^c	4,0 ± 3,8	3,0 ± 2,5	8,2 ± 4,4	5,9 ± 5,0
EB 2000 ^d	5,5 ± 3,5	5,2 ± 3,3	14,0 ± 14,8	5,4 ± 5,0
CONTROLE FR ^a	10,0 ± 8,1	2,4 ± 3,2	10,5 ± 6,1	2,4 ± 3,2
FB 1000 ^e	6,0 ± 7,2	6,1 ± 5,2	13,3 ± 6,9	3,7 ± 5,9
FC 1000 ^f	2,9 ± 1,9	6,2 ± 4,9	8,0 ± 5,5	6,9 ± 4,6
FA 1000 ^g	6,4 ± 5,3	3,1 ± 4,9	6,7 ± 4,8	3,1 ± 4,9

^aControle EB : controle extrato bruto – solução salina 0,9% (solvente dos extratos).

^aControle FR: controle frações – solução salina 0,9% (solvente dos extratos).

^bEB 500 (extrato bruto na dose de 500 mg/Kg); ^cEB 1000 (extrato bruto na dose de 1000 mg/Kg); ^dEB 2000 (extrato bruto na dose de 2000 mg/Kg); ^eFB 1000 (fração butanólica na dose de 1000 mg/Kg); ^fFC 1000 (fração clorofórmica na dose de 1000 mg/Kg); ^gFA 1000 (fração aquosa na dose de 1000 mg/Kg) (Resultados – média ± desvio padrão).

Amostras de sangue periférico 3 horas, 24 horas após aplicação da dose em camundongos machos e fêmeas.

Índice de dano – de zero (sem dano, 100 células X 0) a 400 (com máximo de dano, 100 X 4).

Freqüência de dano – calculada baseada no número de células com dano versos aquelas sem dano.

*p<0,05 ; **p<0,01

Mesmo na maior dose testada (3 x 2000 mg/Kg), o extrato bruto não induziu danos ao DNA em sangue e fígado, pelo teste cometa (Tabela 7). Os animais foram tratados por três dias consecutivos e sacrificados no quarto dia para coleta das amostras de tecidos. As frações (3 x 1000 mg/Kg) também não induziram danos (Tabela 7). Apenas foi observada uma redução significativa da frequência de danos (FD) no tecido hepático, em comparação com o controle negativo, pelo extrato bruto na dose de 500 mg/Kg/dia e 2000 mg/Kg/dia, somente em camundongos machos (Tabela 7).

Tabela 7. Avaliação da atividade genotóxica em camundongos tratados por 3 dias consecutivos com os extratos de *A. chica*.

ÍNDICE DE DANOS GRUPOS	SANGUE		FÍGADO	
	MACHOS	FÊMEAS	MACHOS	FÊMEAS
CONTROLE EB ^a	8,9 ± 10,2	7,7 ± 4,1	29,2 ± 20,3	29,4 ± 20,9
EB 3x 500 ^b	5,7 ± 4,7	9,3 ± 4,3	13,5 ± 15,2	20,7 ± 12,3
EB 3x 1000 ^c	12,6 ± 15,5	8,3 ± 2,1	18,8 ± 9,1	53,0 ± 25,7
EB 3x 2000 ^d	14,3 ± 7,9	5,7 ± 1,7	11,8 ± 9,6	73,1 ± 56,1
CONTROLE FR ^a	10,8 ± 5,3	2,5 ± 2,7	40,8 ± 15,0	20,7 ± 9,3
FB 3x 1000 ^e	11,0 ± 6,6	12,5 ± 17,0	33,5 ± 31,8	14,6 ± 17,4
FC 3x 1000 ^f	7,5 ± 7,5	8,2 ± 6,7	52,7 ± 30,1	15,2 ± 10,0
FA 3x 1000 ^g	9,4 ± 5,2	3,3 ± 2,9	18,8 ± 17,0	25,8 ± 21,4
FREQUÊNCIA DE DANOS				
GRUPOS	MACHOS	FÊMEAS	MACHOS	FÊMEAS
CONTROLE EB ^a	6,4 ± 7,3	6,3 ± 4,5	13,8 ± 8,0	10,4 ± 7,0
EB 3x 500 ^b	3,7 ± 3,3	8,7 ± 4,7	5,8 ± 6,3*	7,8 ± 4,7
EB 3x 1000 ^c	9,3 ± 10,6	8,0 ± 1,7	7,8 ± 4,4	19,0 ± 9,2
EB 3x 2000 ^d	10,4 ± 5,5	5,5 ± 1,2	4,5 ± 3,3*	26,6 ± 20,2
CONTROLE FR ^a	4,2 ± 2,0	2,2 ± 2,7	14,9 ± 4,9	7,2 ± 3,3
FB 3x 1000 ^e	5,3 ± 4,5	7,1 ± 9,6	12,1 ± 10,6	4,8 ± 5,3
FC 3x 1000 ^f	3,3 ± 3,1	4,7 ± 4,0	18,4 ± 11,1	5,7 ± 3,5
FA 3x 1000 ^g	5,1 ± 2,5	2,0 ± 2,1	6,4 ± 5,5	8,5 ± 6,0

^aControle EB : controle extrato bruto – solução salina 0,9% administrada por 3 dias consecutivos(solvente dos extratos).

^aControle FR: controle frações – solução salina 0,9% administrada por 3 dias consecutivos (solvente dos extratos).

^bEB 3x 500 (extrato bruto na dose de 500 mg/Kg/dia por 3 dias); ^cEB 3x 1000 (extrato bruto na dose de 1000 mg/Kg/dia por 3 dias); ^dEB 3x 2000 (extrato bruto na dose de 2000 mg/Kg/dia por 3 dias); ^eFB 3x 1000 (fração butanólica na dose de 1000 mg/Kg/dia por 3 dias); ^fFC 3x 1000 (fração clorofórmica na dose de 1000 mg/Kg/dia por 3 dias); ^gFA 3x 1000 (fração aquosa na dose de 1000 mg/Kg/dia por 3 dias) (Resultados – média ± desvio padrão).

Amostras de sangue e de fígado no sacrifício (24 horas após aplicação da última dose dos extratos) em camundongos machos e fêmeas.

Índice de dano – de zero (sem dano, 100 células X 0) a 400 (com máximo de dano, 100 X 4).

Frequência de dano – calculada baseada no número de células com dano versus aquelas sem dano.

*p<0,05 ; **p<0,01

Para a avaliação do potencial antigenotóxico (Tabela 8 e 9), amostras de sangue e fígado de camundongos foram tratadas com peróxido de hidrogênio 0,20 mM, conforme procedimento *ex vivo*.

Como mostra a tabela 8, as frações não apresentaram proteção ao DNA contra danos provocados pelo peróxido de hidrogênio após 3 horas da administração de 1000 mg/Kg. Entretanto, com o tratamento de 2000 mg/Kg de extrato bruto houve aumento do ID e FD em sangue periférico de fêmeas. Os demais extratos não apresentaram efeito significativo (Tabela 8). Porém, após três dias consecutivos de tratamento com extrato bruto, houve redução significativa do ID e FD de forma dose-dependente, em sangue de camundongos machos, sugerindo proteção contra danos oxidativos induzidos pelo H₂O₂ (Tabela 9), também sendo observado neste extrato um alto percentual de inibição de ID (I%), alcançando valor de 83,7% na dose 3 X 2000 mg/kg. Resultados similares foram observados em amostras de sangue de fêmeas tratados com o extrato bruto (EB 3 x 2000), alcançando I% de 66,6%. Além disso, houve redução de ID e FD em amostras de sangue de machos tratados com a fração clorofórmica (FC 3 x 1000), apresentando inibição I% de 79,2%, porém esta fração não apresentou efeito nas fêmeas. As frações aquosa (FA) e butanólica (FB) não reduziram ID e FD, em relação ao controle positivo. No tecido hepático, tanto o extrato bruto quanto as frações não apresentaram atividades antigenotóxicas (Tabela 9).

Tabela 8. Avaliação da atividade antígeno-tóxica em sangue de camundongos tratados com dose única de extratos de *A. chica*.

ÍNDICE DE DANOS		SANGUE 3 HORAS	
GRUPOS	MACHOS	FÊMEAS	
CONTROLE EB ^a	67,4 ± 38,9	102,1 ± 30,8	
EB 500 ^b	145,3 ± 58,0	106,0 ± 16,5	
EB 1000 ^c	140,6 ± 60,0	111,1 ± 19,5	
EB 2000 ^d	106,4 ± 53,5	165,9 ± 42,8**	
CONTROLE FR ^a	89,1 ± 34,1	78,0 ± 43,9	
FB 1000 ^e	54,8 ± 45,6	97,7 ± 161,4	
FC 1000 ^f	92,9 ± 66,6	103,0 ± 33,3	
FA 1000 ^g	91,5 ± 58,8	-	
FREQÜÊNCIA DE DANOS			
GRUPOS			
CONTROLE EB ^a	23,2 ± 17,4	42,0 ± 11,3	
EB 500 ^b	38,1 ± 28,6	45,5 ± 7,5	
EB 1000 ^c	46,2 ± 19,8	43,1 ± 18,0	
EB 2000 ^d	38,6 ± 19,0	58,8 ± 17,5*	
CONTROLE FR ^a	41,0 ± 11,8	37,7 ± 16,6	
FB 1000 ^e	26,4 ± 19,8	31,3 ± 49,1	
FC 1000 ^f	38,3 ± 19,5	40,3 ± 9,4	
FA 1000 ^g	38,0 ± 22,2	-	

^aControle EB: controle extrato bruto – solução salina 0,9% (solvente dos extratos) + H₂O₂ (0,20 mM).

^aControle FR: controle frações – solução salina 0,9% (solvente dos extratos) + H₂O₂ (0,20 mM).

^bEB 500 (extrato bruto na dose de 500 mg/Kg); ^cEB 1000 (extrato bruto na dose de 1000 mg/Kg); ^dEB 2000 (extrato bruto na dose de 2000 mg/Kg); ^eFB 1000 (fração butanólica na dose de 1000 mg/Kg); ^fFC 1000 (fração clorofórmica na dose de 1000 mg/Kg); ^gFA 1000 (fração aquosa na dose de 1000 mg/Kg) (Resultados – média ± desvio padrão).

Amostras de sangue periférico 3 horas, 24 horas após aplicação da dose em camundongos machos e fêmeas.

Índice de dano – de zero (sem dano, 100 células X 0) a 400 (com máximo de dano, 100 X 4).

Freqüência de dano – calculada baseada no número de células com cauda versus aquelas sem cauda.

*Valor significante = p<0,05; **Valor significante = p<0,01

Tabela 9. Avaliação da atividade antigenotóxica em camundongos tratados por 3 dias consecutivos com os extratos de *A. chica*.

ID	SANGUE		FÍGADO		
	GRUPOS	MACHOS	FÊMEAS	MACHOS	FÊMEAS
CONTROLE EB ^a		195,4 ± 41,8	132,3 ± 53,3	315,6 ± 29,6	253,8 ± 47,0
EB 3x 500 ^b		103,6 ± 55,4** (49,2%) ^h	131,7 ± 49,7	308,2 ± 23,3	253,7 ± 65,9
EB 3x 1000 ^c		43,4 ± 21,5** (81,5%) ^h	73,2 ± 38,6	281,8 ± 30,0	274,2 ± 12,1
EB 3x 2000 ^d		39,2 ± 11,4** (83,7%) ^h	49,3 ± 23,6** (66,6%) ^h	300,0 ± 11,4	229,1 ± 82,3
CONTROLE FR ^a		73,3 ± 62,0	112,3 ± 48,9	250,5 ± 52,9	290,0 ± 19,4
FB 3x 1000 ^e		71,2 ± 58,5	107,0 ± 60,6	240,1 ± 41,5	285,0 ± 28,6
FC 3x 1000 ^f		23,8 ± 17,4* (79,2%) ^h	71,1 ± 19,7	226,4 ± 68,0	238,1 ± 90,9
FA 3x 1000 ^g		33,2 ± 17,7	75,6 ± 66,3	232,0 ± 43,9	248,1 ± 68,9
FD					
GRUPOS					
CONTROLE EB ^a		70,4 ± 15,0	67,1 ± 12,2	93,0 ± 3,7	86,1 ± 16,7
EB 3x 500 ^b		43,1 ± 15,6**	64,0 ± 14,0	93,5 ± 1,6	85,4 ± 22,3
EB 3x 1000 ^c		27,1 ± 19,5**	41,0 ± 16,8	90,5 ± 8,1	93,7 ± 2,9
EB 3x 2000 ^d		27,8 ± 7,7**	28,1 ± 9,6	95,5 ± 2,4	82,5 ± 19,1
CONTROLE FR ^a		35,5 ± 21,4	51,0 ± 18,8	86,4 ± 11,3	93,2 ± 4,4
FB 3x 1000 ^e		34,8 ± 23,7	47,8 ± 19,8	89,5 ± 6,8	94,0 ± 3,4
FC 3x 1000 ^f		15,7 ± 11,3*	45,4 ± 14,5	81,6 ± 23,9	80,8 ± 29,8
FA 3x 1000 ^g		22,0 ± 10,0	41,8 ± 29,5	85,1 ± 14,8	81,2 ± 21,7

^aControle EB: controle extrato bruto – solução salina 0,9% (solvente dos extratos) + H₂O₂ (0,20 mM).

^aControle FR: controle frações – solução salina 0,9% (solvente dos extratos) + H₂O₂ (0,20 mM).

^bEB 3x 500 (extrato bruto na dose de 500 mg/Kg/dia por 3 dias); ^cEB 3x 1000 (extrato bruto na dose de 1000 mg/Kg/dia por 3 dias); ^dEB 3x 2000 (extrato bruto na dose de 2000 mg/Kg/dia por 3 dias); ^eFB 3x 1000 (fração butanólica na dose de 1000 mg/Kg/dia por 3 dias); ^fFC 3x 1000 (fração clorofórmica na dose de 1000 mg/Kg/dia por 3 dias); ^gFA 3x 1000 (fração aquosa na dose de 1000 mg/Kg/dia por 3 dias) (Resultados – média ± desvio padrão).

^hl%: porcentagem de inibição do ID = [ID do H₂O₂ – ID do extrato com H₂O₂] / [ID do H₂O₂ – ID do controle negativo] x 100.

Amostras de sangue e de fígado no sacrifício (24 horas após aplicação da última dose dos extratos) em camundongos machos e fêmeas.

ID: Índice de dano – de zero (sem dano, 100 células X 0) a 400 (com máximo de dano, 100 X 4).

FD: Frequência de dano – calculada baseada no número de células com dano versus aquelas sem dano.

*p ≤ 0,05 ; **p ≤ 0,01

4.5 Teste de micronúcleos

Após o tratamento por 3 dias com os extratos e frações das partes aéreas oxidadas de *A. chica*, no quarto dia foi realizado o teste de micronúcleos em medula óssea de camundongos. Cabe ressaltar também que o controle positivo utilizado para o teste foi o mutágeno ciclofosfamida na dose de 20 mg/Kg/dia, administrados no segundo e terceiro dia de tratamento por via intraperitoneal.

Não houve diferença estatisticamente significativa dos valores obtidos pela razão EPC/ENC entre os grupos tratados com o extrato bruto e frações (Tabela 10), indicando que não houve toxicidade para as células da medula óssea. A Tabela 10 mostra também que não houve aumento da frequência de micronúcleos nos grupos de machos tratados em relação ao controle negativo. Entretanto em fêmeas, somente houve aumento na frequência de micronúcleos na dose mais alta do EB (2000 mg/Kg/dia), em contrapartida, na média por grupo para o EB não foram observadas diferenças significativas em relação ao controle negativo para a frequência de micronúcleos. Apenas no controle positivo, que recebeu ciclofosfamida, foi observado aumento na frequência de micronúcleos e diminuição na média da razão EPC/ENC.

Tabela 10. Análise de micronúcleos de medula óssea de camundongos tratados por 3 dias com os extratos de *A.chica*.

Grupo	Sexo	Média \pm DP EPCMNs Por Sexo	Média \pm DP EPCMNs Por Grupo	Média da razão EPC/ ENC \pm DP Por Sexo	Média da razão EPC/ ENC \pm DP Por grupo
CN	M	2,8 \pm 1,6	3,0 \pm 0,3	2,5 \pm 0,7	2,2 \pm 0,4
EB ⁽¹⁾	F	3,2 \pm 1,1		1,9 \pm 0,4	
CP EB ⁽²⁾	M	11,6 \pm 1,3 ^{(a)*}	13,4 \pm 2,5 ^{(a)*}	0,3 \pm 0,2 ^{(a)**}	0,3 \pm 0,1 ^{(a)**}
	F	15,2 \pm 3,3 ^{(a)**}		0,2 \pm 0,1 ^{(a)**}	
EB	M	2,0 \pm 1,7	2,8 \pm 1,1	2,5 \pm 0,6	1,9 \pm 0,8
500 ⁽³⁾	F	3,6 \pm 0,9		1,4 \pm 0,5	
EB	M	1,8 \pm 1,5	2,1 \pm 0,4	2,9 \pm 1,3	2,3 \pm 0,8
1000 ⁽⁴⁾	F	2,4 \pm 2,1		1,7 \pm 1,2	
EB	M	2,2 \pm 2,1	4,9 \pm 3,8	2,2 \pm 0,7	1,6 \pm 0,8
2000 ⁽⁵⁾	F	7,6 \pm 4,3 ^{(a)*}		1,1 \pm 0,4 ^{(a)*}	
CN	M	1,4 \pm 1,7	2,7 \pm 1,8	4,2 \pm 1,7	2,9 \pm 1,9
FR ⁽¹⁾	F	4,0 \pm 1,6		1,6 \pm 0,4	
CP FR ⁽²⁾	M	11,6 \pm 0,9 ^{(a)**}	16,0 \pm 6,2 ^{(a)*}	0,3 \pm 0,2 ^{(a)**}	0,4 \pm 0,1 ^{(a)**}
	F	20,4 \pm 3,3 ^{(a)**}		0,5 \pm 0,3 ^{(a)**}	
FB	M	1,4 \pm 0,9	1,8 \pm 0,6	2,2 \pm 1,3	2,0 \pm 0,2
1000 ⁽⁶⁾	F	2,2 \pm 0,8		1,9 \pm 1,0	
FC	M	1,2 \pm 1,6	2,8 \pm 2,3	4,2 \pm 2,9	3,0 \pm 1,7
1000 ⁽⁷⁾	F	4,4 \pm 0,9		1,9 \pm 0,7	
FA	M	2,8 \pm 2,8	4,4 \pm 2,3	2,5 \pm 1,4	3,0 \pm 0,7
1000 ⁽⁸⁾	F	6,0 \pm 3,3		3,6 \pm 2,3 ^{(a)*}	

Resultados: Média \pm DP (desvio padrão).Foram testados através da análise da variância (ANOVA) seguida pelo teste Dunnet.

M: Camundongos machos ; F: Camundongos fêmeas

⁽¹⁾CN EB (Controle negativo extrato bruto) e ⁽¹⁾CN FR (Controle negativo frações) – tratamento com NaCl 0,9%.

⁽²⁾CP EB (Controle positivo extrato bruto) e ⁽²⁾ CP FR (Controle positivo frações) – tratamento com CP (ciclofosfamida) 2 X 20 mg/Kg.

EB: extrato bruto nas doses de 500⁽³⁾, 1000⁽⁴⁾ e 2000⁽⁵⁾ mg/Kg/dia; ⁽⁶⁾FB 1000: fração butanólica na dose de 1000 mg/Kg/dia; ⁽⁷⁾FC 1000: fração clorofórmica na dose de 1000 mg/Kg/dia e ⁽⁸⁾FA 1000: fração aquosa na dose de 1000 mg/Kg/dia,

EPC/ENC : razão entre eritrócitos policromáticos e normocromáticos.

^(a) Significância estatística quando comparado ao controle negativo - *p \leq 0,05 ; **p \leq 0,01

4.6 Teste hipoxantina/xantina oxidase

Conforme Figura 13, os extratos da planta verde de *A.chica* demonstraram significativa diminuição na concentração dos ácidos dihidroxibenzóicos (DHBA), produtos da ação do radical hidroxil sobre o ácido salicílico (OWEN, 1996). A redução de DHBA dos extratos testados foi de forma dose-dependente nas concentrações testadas de 0,1 a 2 mg/mL, onde os extratos apresentaram índices de redução (IC 50= índice de redução da concentração de DHBA em 50%) de EBV (IC50 = 0,439 mg/mL); FBV (IC50 = 0,16 mg/mL); FCV (IC50 = 0,469 mg/mL) e FAV (IC50= 0,717 mg/mL). Os valores em porcentagem da diminuição de DHBA até a concentração máxima de 2 mg/ml foram de 85% para EBV; 85% para FBV ; 58% para FCV e 82% para FAV.

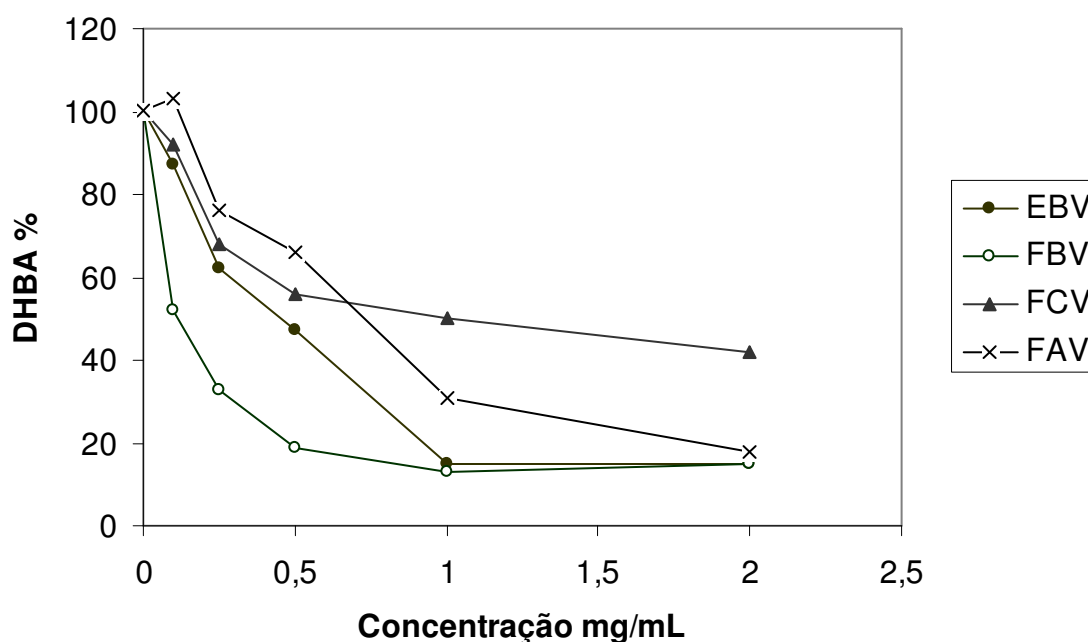


Figura 13. Inibição da geração de espécies reativas de oxigênio pela *A.chica* planta verde (V) no teste hipoxantina/xantina oxidase. (EBV) Extrato bruto verde; (FBV) fração butanólica verde; (FCV) Fração clorofórmica verde; (FAV) fração aquosa verde.

Os extratos da planta oxidada de *A.chica* (Figura 14) demonstraram significativa diminuição na concentração dos ácidos dihidroxibenzoicos (DHBA) de forma dose-dependente. Os valores da redução do DHBA nos extratos de *A.chica* planta oxidada, em porcentagem foram de 77% para EBO; 70% para FBO; 50% para FCO e 91% para FAO. E a redução dos extratos para doses de 0,1 a 2 mg/mL a 50% do DHBA em EBO (IC₅₀ = 0,503 mg/mL); FBO (IC₅₀ = 0,16 mg/mL); FCO (IC₅₀ = 0,838 mg/mL); FAO (IC₅₀ = 0,156 mg/mL).

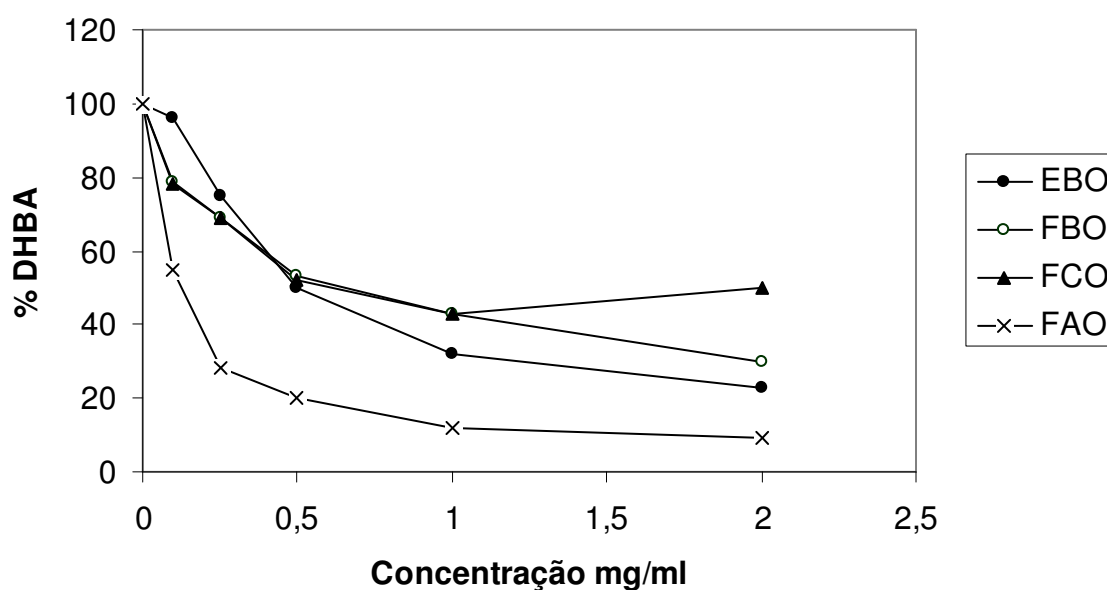


Figura 14. Inibição da geração de espécies reativas de oxigênio pela *A.chica* planta oxidada no teste hipoxantina/xantina oxidase. (EBO) Extrato bruto oxidado; (FBO) Fração butanólica oxidada; (FCO) Fração clorofórmica oxidada; (FAO) fração aquosa oxidada.

5 DISCUSSÃO

A família Bignoniaceae é conhecida por conter uma grande variedade de plantas com intensa ocorrência no cerrado brasileiro. A espécie *Arrabidaea chica* pertence a esta família e no Brasil ocorre desde a Amazônia até o Rio Grande do Sul (TAKEMURA *et al.*, 1995). Alguns representantes deste gênero como a *Arrabidaea samydoides*, *A. brachypoda* e *A. triplinervia* demonstraram efeito antioxidante (PAULETTI *et al.*, 2003b), atividade antifúngica (ALCERITO *et al.*, 2002) e atividade contra doença de Chagas (LEITE *et al.*, 2006), respectivamente. Tendo em vista que *A. chica* é utilizada popularmente e não há relatos de estudos avaliando as propriedades biológicas, toxicidade e segurança do uso desta planta, este trabalho se propôs a avaliar a atividade mutagênica genotóxica/antigenotóxica e antioxidante do extrato bruto e frações das partes aéreas de *A. chica*.

Na análise fitoquímica de *A. chica* (Tabela 1) realizada com as partes aéreas da planta seca verde e planta seca oxidada, foram detectados, em ambas amostras, saponinas, alcalóides, flavonóides e compostos fenólicos. Por outro lado, cumarinas, taninos, antraquinonas e cardiotônicos não foram encontrados nesta planta. Com base nestes resultados, sugere-se uma composição química semelhante para a planta verde e oxidada.

A ocorrência de saponinas em *A. chica* parece ser coerente, pois na espécie *Catalpa bignonioides*, pertencente a família Bignoniaceae, foram encontrados saponinas (MUÑOZ-MINGARRO *et al.*, 2003). Nesta família há relatos de alcalóides monoterpênicos encontrados no gênero *Incarville*, os quais se destacam por sua atividade antinociceptiva (MING *et al.*, 1992). Para o gênero *Arrabidaea* a literatura relata a presença de flavonóides nas espécies *Arrabidaea chica* (TAKEMURA *et al.*, 1995; ZORN *et al.*, 2001), *A. brachypoda* (ALCERITO *et al.*, 2002) e *A. samydoides* (PAULETTI *et al.*, 2003a). Em contrapartida, os taninos descritos no estudo de Takemura *et al.* (1995) não foram caracterizados pela análise fitoquímica. A ausência de cumarinas, cardiotônicos e antraquinonas estão de acordo com a literatura, que não relata a ocorrência de compostos desta classe para a família Bignoniaceae.

Os extratos de *A. chica* foram avaliados quanto à genotoxicidade pelo teste cometa *in vitro* com a planta seca verde (V) (Tabela 2) e seca oxidada (O) (Tabela 3). Somente o extrato bruto oxidado (EBO) na dose máxima de 10 mg/ml e fração aquosa oxidada (FAO) (5 e 7,5 mg/ml) apresentaram genotoxicidade nas condições testadas, o que não ocorreu na planta verde, apesar de apresentarem uma constituição química qualitativamente similar.

Porém, na avaliação genotóxica, utilizando o teste cometa *in vivo* em camundongos tratados com o extrato bruto e frações oxidadas de *A. chica*, não foi observada indução de danos ao DNA em amostras de sangue e tecido hepático (Tabela 6 e 7), sugerindo que nas condições testadas o extrato bruto, fração butanólica, clorofórmica e aquosa não apresentaram genotoxicidade.

O resultado positivo em sistemas *in vitro* nem sempre é garantia de positividade *in vivo*, pois no teste *in vivo*, deve-se levar em consideração alguns fatores que são exclusivos, tais como: absorção (motilidade gastrointestinal, pH, tamanho das partículas e interação físico-química), distribuição e excreção das substâncias (HARDMAN e LIMBIRD, 2003; TWEATS *et al.*, 2007). Ainda, a metabolização pode explicar as diferenças obtidas entre os resultados dos testes cometa *in vitro* e *in vivo* da planta oxidada (Tabelas 3, 6 e 7), pois no teste *in vivo* componentes do extrato podem sofrer biotransformação, pelas enzimas do citocromo P450, para compostos inativos. Outro fator que diferencia estes testes é o tempo de exposição das células aos extratos e as concentrações utilizadas.

O conjunto dos resultados do teste cometa sugere que EBO e FAO apresentam ação genotóxica direta, como observado no teste *in vitro*, que avaliou ação direta dos extratos (Tabela 3), sem metabolização. Entretanto estes extratos não apresentam atividade genotóxica no teste *in vivo* (Tabelas 6 e 7) que avaliou a ação indireta, pois a metabolização provavelmente inativou os componentes genotóxicos.

EBV, FBV, FCV, EBO e FBO protegeram o DNA contra danos gerados pelo peróxido de hidrogênio no teste cometa *in vitro* (Tabelas 4 e 5). Cabe

salientar que todos os extratos mencionados acima, mostraram percentuais de inibição do ID (I%) acima de 50%, indicando um alto potencial antigenotóxico.

A atividade antigenotóxica foi avaliada no teste cometa *in vivo*, utilizando o mesmo agente oxidante, peróxido de hidrogênio, para induzir danos ao DNA, conforme Pereira *et al.* (2005). No tratamento em dose única, dos extratos das partes aéreas oxidadas de *A. chica* (Tabela 8), não foi observada proteção contra danos oxidativos ao DNA em amostras de sangue e fígado. Entretanto, nos camundongos machos tratados por 3 dias (Tabela 9), o extrato bruto (EB), nas 3 concentrações testadas, foi antigenotóxico de forma dose-dependente, alcançando percentual de inibição de ID acima de 80%. Este efeito não foi tão pronunciado em camundongos fêmeas, pois somente a dose máxima de EB foi estatisticamente significativa. Porém nas concentrações menores do extrato, apesar de não apresentar significância estatística, produziram redução do índice e frequência de danos. Em adição aos resultados de EB, a fração clorofórmica (FC) no tratamento por 3 dias consecutivos apresentou proteção contra danos oxidativos em amostras de sangue dos camundongos machos. Para a planta oxidada, os dados obtidos *in vivo* reforçam os dados antigenotóxicos obtidos anteriormente *in vitro*. Porém a fração butanólica oxidada (FBO) não apresentou efeito antigenotóxico na avaliação *in vivo*, sugerindo que a ação protetora da fração butanólica é direta, ou seja, que as substâncias com atividade *in vitro* possivelmente foram metabolizadas tornando-se inativas (TWEATS *et al.*, 2007).

A proteção exercida pelos EBO e FCO ao DNA, verificada pela ação antigenotóxica *ex vivo*, pode ter ocorrido devido ao seqüestro de radicais livres, ativação de enzimas antioxidantes e/ou ligação com o íon ferro, dificultando a reação de Fenton (SZETO *et al.*, 2002).

É possível que o efeito antigenotóxico encontrado na fração clorofórmica esteja relacionado à presença de antocianidinas, anteriormente isoladas do extrato éter etílico das folhas de *A. chica* (ZORN *et al.*, 2001), pois foi demonstrado por Pool-Zobel *et al.* (1999) que algumas antocianidinas

apresentam potencial antioxidante *in vitro*. Outros estudos indicaram que as antocianidinas, podem ser responsáveis pela proteção contra radicais peroxil (WANG *et al.*, 1999; AZEVEDO *et al.*, 2007). A ação antígeno-tóxica do extrato bruto e fração butanólica pode estar ligada a presença de flavonóides, que foram quantificados neste estudo em 1,8% de quercetina. Além disso, já foi relatada a presença do flavonóide denominado carajuflavona (6,7,3',4'-tetraidroxi-5-metóxi-flavona), presente no extrato metanólico das folhas de *A. chica* (TAKEMURA *et al.*, 1995). Tendo em vista que os flavonóides possuem a habilidade de seqüestrar radicais livres como o ânion superóxido, o radical hidroxil e peroxil (RICE-EVANS *et al.*, 1996), pode-se sugerir que a presença desta classe no extrato bruto e fração butanólica esteja relacionada com a atividade antígeno-tóxica observada.

Uma vez verificado que o extrato bruto e frações de *A. chica*, apresentaram atividade antígeno-tóxica, possivelmente por mecanismo antioxidante, o extrato bruto e frações da planta seca verde (Figura 13) e oxidada (Figura 14) foram avaliados no teste *in vitro* da hipoxantina/xantina oxidase, que quantifica a capacidade dos extratos seqüestrarem radicais hidroxil. O extrato bruto e frações demonstraram redução significativa na concentração dos ácidos dihidroxibenzoícos (DHBA), produtos da ação do radical hidroxil sobre o ácido salicílico (OWEN, 1996), indicando que os extratos desta planta possuem atividade antioxidante seqüestradora de radicais hidroxil. Os extratos apresentaram diminuição dos DHBA em 91% para FAO, 85% para EBV e FBV, 82% para FAV, 77% para EBO, 70% para FBO, 58% para FCV e 50% para FCO. Com base nestes resultados, verifica-se que de um modo geral, a planta verde apresentou maior atividade antioxidante quando comparada à planta oxidada, sugerindo que compostos antioxidantes estão presentes em maior quantidade ou são mais ativos na planta verde. Mesmo sabendo que qualitativamente a planta verde e oxidada apresentaram a mesma constituição química, a oxidação de compostos pode ter alterado a concentração de substâncias responsáveis pela atividade antioxidante da planta verde. É interessante mencionar que a FA demonstrou atividade antioxidante neste teste nas concentrações de 0,1 a 2 mg/ml, enquanto que

doses mais elevadas, de 5 a 10 mg/ml, no teste cometa *in vitro* demonstraram efeito genotóxico. Esses achados corroboram outros estudos que evidenciam atividade pró-oxidante de alguns compostos antioxidantes, provocando efeitos genotóxicos em algumas circunstâncias e particularmente em altas concentrações (SZETO *et al.*, 2002).

O teste de micronúcleos é recomendado pelas agências regulatórias em todo mundo, sendo apropriado na detecção de clastogênese (quebra cromossômica) e aneugênese (perda de cromossomos inteiros) (KRISHNA e HAYASHI, 2000). Neste trabalho, o teste de micronúcleos foi conduzido conforme recomendações internacionais, descritas em Mavournin *et al.* (1990) e Miller *et al.* (1997).

O extrato bruto e frações de *A. chica* não aumentaram a frequência de micronúcleos de forma dose-dependente, sugerindo que o extrato bruto e frações da planta não causaram danos cromossômicos, como aneugênese e clastogênese, em medula óssea de camundongos nas condições testadas. No controle positivo (grupo ciclofosfamida), foi observado uma diminuição na média da razão EPC/ENC, sugerindo que o tratamento foi tóxico para a medula óssea na dose testada de 2 X 20 mg/Kg (Tabela 10). O mesmo pode ser observado para o grupo de fêmeas que recebeu 3 X 2000 mg/kg do EBO. Houve aumento significativo na frequência de micronúcleos para este grupo, porém, como não foi observada uma relação dose-resposta, o resultado pode ser considerado negativo.

Desta forma, o conjunto de resultados demonstra a importância da atividade antígenotóxica observada no extrato bruto e frações clorofórmica (teste cometa *in vitro* e *in vivo*) e butanólica (somente teste cometa *in vitro*). O extrato bruto e fração clorofórmica são os extratos mais promissores deste estudo quanto ao potencial antígenotóxico, principalmente na atividade verificada no teste cometa *in vivo*, devido a metabolização dos compostos. Alguns estudos verificaram presença de flavonóides em *A. chica*, (TAKEMURA *et al.*, 1995; ZORN *et al.*, 2001), sendo assim, torna-se fundamental avaliar

quais substâncias nestes extratos apresentam atividade antígenotóxica. O potencial antioxidante observado em todos os extratos de *A. chica* no teste hipoxantina/xantina oxidase, torna fundamental a identificação dos compostos responsáveis pela atividade antioxidante encontrada. É importante ressaltar que os extratos desta planta não apresentaram atividade genotóxica no teste cometa tanto *in vitro* e *in vivo*, bem como não foram mutagênicos no teste de micronúcleos. Com base nestes dados é fundamental mais estudos com esta planta de forma de garantir a eficácia e segurança para o uso popular

6. CONCLUSÃO

Os dados obtidos neste trabalho permitem concluir que:

6.1. A composição química da planta verde e oxidada de *A. chica* são semelhantes apresentando saponinas, alcalóides, flavonóides e compostos fenólicos.

6.2. No teste cometa *in vitro*, apresentaram genotoxicidade o extrato bruto oxidado (EBO) na dose máxima (10 mg/ml) e fração aquosa oxidada (FAO) nas concentrações de 5 e 7,5 mg/ml. E os extratos da planta verde não apresentaram genotoxicidade nas condições testadas.

6.3. No teste cometa *in vivo*, os extratos bruto e frações de *A. chica* da planta oxidada não apresentaram genotoxicidade nos dois tratamentos (dose única e 3 dias).

6.4. Na avaliação antigenotóxica através do teste cometa *in vitro*, os extratos bruto (EBV), fração butanólica (FBV) e fração clorofórmica (FCV) da planta verde protegeram o DNA contra danos gerados pelo peróxido de hidrogênio. Na planta oxidada apresentaram atividade antigenotóxica o extrato bruto (EBO) e fração butanólica (FBO).

6.5. O extrato bruto e frações da planta oxidada, no teste cometa *ex vivo*, demonstraram que somente o tratamento de 3 dias apresentou atividade protetora ao DNA. O extrato bruto (EB) em machos nas 3 concentrações, o EB em fêmeas na dose máxima e a fração clorofórmica (FC) apresentaram atividade antigenotóxica nestas condições.

6.6. No teste *in vitro* da hipoxantina/xantina oxidase todos os extratos testados de *A. chica* da planta verde e oxidada apresentam atividade antioxidante.

6.7. O extrato bruto e frações de *A. chica* não apresentaram mutagenicidade no teste de micronúcleos em medula óssea de camundongos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALCERITO, T., BARBO, F.E., NEGRI, G. SANTOS, D.Y.A.C., MEDA, C.I., YOUNG, M.C.M., CHÁVEZ, D., BLATT, C.T.T. Foliar epicuticular wax of *Arrabidaea brachypoda*: flavonoids and antifungal activity. *Biochemical Systematics and Ecology*, v.30, p. 677-683, 2002.
- AUGUSTO, O. *Radicais Livres: bons, maus e naturais*. São Paulo: Oficina de Textos, 2006.
- AZEVEDO, L., LIMA, P.L.A., GOMES, J.C., STRINGHETA, P.C., RIBEIRO, D.A., SALVADORI, D.M.F. Differential response related to genotoxicity between eggplant (*Solanum melanogena*) skin aqueous extract and its main purified anthocyanin (delphinidin) *in vivo*. *Food and Chemical Toxicology*, v.45, p. 852-858, 2007.
- BARBOUTI, A., DOULIAS, P-T., ZHU, B-Z., FREI, B. GALARIS, D. Intracellular iron, but not copper, plays a critical role in hydrogen-induced DNA damage. *Free Radical Biology & Medicine*, v.31, p. 490-498, 2001.
- BITTENCOURT, N.S., GIBBS, P.E., SEMIR, J. Histological Study of Post-pollination Events in *Spathodea campunulada* Beav. (Bignoniaceae), a Species with Late-acting Self-incompatibility. *Annals of Botany*, v.91, p.827-834, 2003.
- BORELLA, M.L.L., VARELA, Q.D. *Antioxidantes Enzimáticos*: In: SALVADOR, M., HENRIQUES, J.A.P. (Org). *Radicais Livres e a resposta Celular ao Estresse Oxidativo*. Canoas: Ulbra, 2004.
- BOVERIS, A. Biochemistry of free radicals: from electrons to tissues. *Buenos Aires: Medicina*, v.58, p. 350-356, 1998.
- BROZMANOVÁ, J., DUDÁS, A., HENRIQUES, J.A.P. Repair of oxidative DNA damage – an important factor reducing cancer risk. Minireview. *Neoplasma*, v.48, p.85-93, 2001.
- CHAPMAN, E., PERKIN, A.G., ROBINSON, R. *J. Chem Soc*, p. 3015, 1927.
- CHOY, WN.; Regulatory genetic toxicology tests. *In Genetic Toxicology and Cancer Risk Assessment (Choy, WN Ed)*, Marcel Dekker, Inc. New York, p.93-113, 2001.

DA SILVA, J., ERDTMANN, B., HENRIQUES, J.A.P. (Org). *Genética Toxicológica*. Porto Alegre: Alcance, 2003.

DEVIA, B., LLABRES, G., WOUTERS, J., DUPONT, L., ESCRIBANO-BAILON, M.T., DE PASCUAL-TERESA, S., ANGENOT, L., TITS, M. New-3-doxyanthocyanidins from leaves of *Arrabidaea chica*. *Phytochemical Analysis*, v.13, p.114-120, 2002.

DUEZ, P., DEHON, G., KUMPS, A., DUBOIS, J. Statistics of the Comet assay: a key to discriminate between genotoxic effects. *Mutagenesis*, v.18, p.159-166, 2003.

ENGELHARDT, J.F. Redox-mediated gene therapies for environmental injury: approaches and concepts. *Antioxidants & Redox Signaling*, v.1, p.5-27, 1999.

Farmacopéia Brasileira: Parte II. 4 Fascículo. 4.ed. São Paulo: Atheneu, 2002.

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique to predict chemosensitivity. *Methods in Molecular Medicine*, v.111, p.3-32, 2005.

FRANKE, I.R., BOEIRA, J.M. ERDTMANN, B., HENRIQUES, J.A.P. *Genotoxicidade de Agentes Sintéticos e Naturais*. In: DA SILVA, J., ERDTMANN, B., HENRIQUES, J.A.P. (Org). *Genética Toxicológica*. Porto Alegre: Alcance, p. 309-324, 2003.

FRIDOVICH, I. Oxygen toxicity: a radical explanation. *The Journal of experimental biology*, v.201, p.1203:1209, 1998.

GARCEZ, M. et al. *Radicais livres e espécies reativas*. In: SALVADOR, M., HENRIQUES, J.A.P. (Org). *Radicaís Livres e a resposta Celular ao Estresse Oxidativo*. Canoas: Ulbra, 2004.

GONZÁLEZ, B., SUÁREZ-ROCA, H., BRAVO, A., SALAS-AUVERT, R., AVILA, D. Chemical Composition and Biological Activity of Extracts from *Arrabidaea bilabiata*. *Pharmaceutical Biology*, v.38, p. 287-290, 2000.

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C. *Free Radic. Biol. Med.* 3 ed. Clarendon: Oxford, 2000.

- HARBORNE, J.B. *Comparative Biochemistry of the Flavonoids*. London: Academic Press, 1967.
- HARBORNE, J.B. *Phytochemical Methods*. 3.ed. Chapman &Hall, 1998.
- HARBORNE, J.B., WILLIAMS, C.A. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, v.55, p. 481-504, 2000.
- HARDMAN, J.G., LIMBIRD, L.E. *Goodman e Gilman's: As Bases Farmacológicas da Terapêutica*. 10.ed. Rio de Janeiro: MacGraw Hill, 2003.
- HARTMANN, A, AGURELL, E., BEEVERS, C., BRENDLER-SCHWAAB, S., BURLINSON, B., CLAY, P., et al. Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. *Mutagenesis*, v.18, p. 45-51, 2003.
- HARTMANN, A., SCHUMACHER, M., HELBIG, U.P., LOWE, P., SUTER, W., MUELLER, L. Use of alkaline *in vivo* comet assay for mechanistic genotoxicity investigations. *Mutagenesis*, v.19, p.51-59, 2004.
- HASLAM, E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs and medicines: possible modes of action. *Journal of Natural Products*, v,59, p.205-215, 1996.
- HWANG, E-S., KIM, G-H. Biomarkers for oxidative stress status of DNA, lipids, and proteins *in vitro* and *in vivo* cancer research. *Toxicology*, v.229, p.1-10, 2007.
- KAPISZEWSKA, M., SOLTYS, E., VISIOLI, F., CIERNIAK, G., ZAJAC, G. The protective ability of the mediterranean plant extracts against the oxidative DNA damage. The role of the radical oxygen species and the polyphenol content. *Journal of physiology and pharmacology*. v.56, p.183-197, 2005.
- KARIHTALA, P., SOINI, Y. Reactive oxygen species and antioxidant mechanisms in human tissues and their relation to malignancies. *APMIS*, v. 115, p. 81-103, 2007.
- KRISHNA, G., HAYASHI, M. In vivo rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. *Mutation Research*, v. 455, p. 155-166, 2000.

- LEITE, J.P.V., OLIVEIRA, A.B., LOMBARDI, J.A., FILHO, J.D.S., CHIARI, E. Trypanocidal activity of Triterpenes from *Arrabidaea triplinervia* and derivatives. *Biological & pharmaceutical bulletin*. v.29, p.2307-2309, 2006.
- LEMOS, C. T.; TERRA, N. R. *Poluição Causas, Efeitos e Controle*. In: DA SILVA, J., ERDTMANN, B., HENRIQUES, J.A.P. (Org). *Genética Toxicológica*. Porto Alegre: Alcance, 2003.
- LLESUY, S.F. *Introducción y Especies Activas de Oxígeno*. In: MARRONI, N.P (Org). *Estresse Oxidativo e Antioxidantes*. Canoas: Ulbra, 2002.
- MACIEL, M.A.M., PINTO, A.C. VEIGA JR., V.F., GRYNBERG, N.F., ESCHEVARRIA, A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. *Química Nova*, v. 25, p.429-438, 2002
- MARNETT, L.J. Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis*, v.21, p.361-370, 2000.
- MAVOURNIN, K.H., BLAKEY, D.H., CIMINO, M.C., SALAMONE, M.F., HEDDLE, J.A. The in vivo micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutation Research*, v.239, p.29-80, 1990.
- MILLER, B., ALBERTINI, S. LOCHER, F., THYBAUD, V., LORGE, E. Comparative evaluation of the in vitro micronucleus test and in vitro chromosome aberration test: industrial experience. *Mutation Research*, v.392, p.45-59, 1997.
- MING, C.Y. et al. A monoterpene alkaloid from *Incarvillea sinensis*. *Phytochemistry*, v.31, p. 2930-2932, 1992.
- MOURA D.J., RICHTER, M.F., BOEIRA, J.M., HENRIQUES J.A.P., SAFFI, J. Antioxidant properties of b-carboline alkaloids are related to their antimutagenic and antigenotoxic activities. *Mutagenesis*, p. 1-10, 2007.
- MUÑOZ-MINGARRO, D., ACERO, N., LLINARES, F. POZUELO, J.M., GALÁN DE MERA, A., VICENTEN, J.A., MORALES, L., ALGUACIL, L.F., PÉREZ, C. Biological activity of extracts from *Catalpa bignonioides* Walt (Bignoniaceae). *Journal of ethnopharmacology*, v.87, p.163-167, 2003.
- NADIN, S.B., VARGAS-ROIG, M.L., CIOCCA, D.R. A silver staining for single-cell gel assay. *The journal of histochemistry and Cytochemistry*, v.49, p.1183-1186, 2001.
- OSAWA T. Plant Antioxidants: Protective Role Against Oxygen Radical Species. *Cosmetic & Toiletries*, v.109, p.77-81, 1994.

- OWEN, R.W, WIMONWATWATEE, T., SPIEGELHALDER, B., et al. A high performance liquid chromatography system for quantification of hydroxyl radical formation by determination of dihydroxy benzoic acids. *European Journal Cancer Prevention*, v.5, p.233-240, 1996.
- OWEN, R.W., SPIEGELHALDER, B., BARTSCH, H. Generation of reactive oxygen species by the faecal matrix. *GUT*, v.46, p.225-232, 2000.
- PAULETTI, P.M., BOLZANI, V.S., YOUNG, M. C.M. Constituintes Químicos de *Arrabidaea samydoidea* (Bignoniaceae). *Química Nova*, v.26, p.641-643, 2003a.
- PAULETTI, P.M., CASTRO-GAMBOA, I., SILVA, D.H.S., YOUNG, M.C.M., TOMAZELA, D.M., EBERLIN, M.N., BOLZANI, V.S. New Antioxidant C-Glucosylxanones from the Stems of *Arrabidaea samydoidea*. *Journal of Natural Products*. v.66, p. 1384-1387, 2003b.
- PEREIRA, P., TYSCA, D., OLIVEIRA, P., DA SILVA BRUM, L.F., PICADA, J.N., ARDENGHI, P. Neurobehavioral and genotoxic aspects of rosmarinic acid. *Pharmacological Research*, v.52, p.199-203, 2005.
- PONNIAH, L., SESHADRI, T.R. Nuclear oxidation in flavones and related compounds. *Proceedings of the Indian Academy of Science*, v. 38, p.77-83, 1953.
- POOL-ZOBEL, B.L., BUB, A., SCHRÖDER, N., RECHKEMMER, G. Anthocyanins are potent antioxidants in model systems but do not reduce endogenous oxidative DNA damage in human colon cells. *European Journal of Nutrition*, v.38, p. 227-234, 1999.
- POSER, G.L.V., SCHRIPEMA, J., HENRIQUES, A.T., JENSEN, S.R. The distribution of iridoids in Bignoniaceae. *Biochemical Systematics and Ecology*, v.28, p. 351-366, 2000.
- RATES, S.M.K. Promoção do uso racional de fitoterápicos: uma abordagem no ensino de Farmacognosia. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.11, p.57-69, 2001.
- REITZ, P.R. Flora Ilustrada Catarinense. *Bignoniáceas por N.y Sandwith e D. R. Hunt*. Itajaí, 1974.
- RIBEIRO, L.R., SALVADORI, D.M.F., MARQUES, E.K. (Org). *Mutagênese Ambiental*. Canoas: Editora da Ulbra, 2003.
- RICE-EVANS, C.A. Plant polyphenols: free radical scavengers or chain-breaking antioxidants? *Biochemical Society Symposium*, v. 61, p. 103-116, 1995.

- RICE-EVANS, C.A., MILLER, N.J., PAGANGA, G. Structure–antioxidant activity relationship of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 20, p. 933-956, 1996.
- RICE-EVANS, C.A., MILLER, N.J., PAGANGA, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science*, v. 2, p. 152-159, 1997.
- RICE-EVANS, C. A. Flavonoid antioxidants. *Current Medicinal Chemistry*, v. 8, p. 797-807, 2001.
- ROSA, R.M., PICADA, J.N., SAFFI, J. HENRIQUES, J.A.P. Cytotoxic, genotoxic and mutagenic effect of diphenyl diselenide in Chinese hamster lung fibroblasts. *Mutation Research*, *In press*, 2007.
- RUNDELL, M. S., WAGNER, E. D., PLEWA, M. J. The Comet Assay: Genotoxic Damage or Nuclear Fragmentation? *Environmental and Molecular Mutagenesis*, v.42, p.61-67, 2003.
- SANTOS, S.C.; MELLO, J.C.P. *Taninos*. In: SIMÕES, C. M. O., SCHENKEL, E.P., GOSMANN, G., MELLO, J.C.P., MENTZ, L.A., PETROVICK, P.R. *Farmacognosia da planta ao medicamento*. 2 ed. Porto Alegre: Ed Universidade UFRGS, p. 517-544, 2000.
- SASAKI, Y.F., KAWAGUCHI, S., KAMAYA, A., OHSHITA, M., KABASAWA, K., IWAMA, K., TANIGUCHI, K., TSUDA, S.; The comet assay with 8 mouse organs: results with 39 currently used food additives. *Mutation Research*, v.519, p.103-119, 2002.
- SCHNEIDER, E. P. M., LONDERO I. W. B. *Flora Ilustrada do Rio Grande do Sul. Fascículo VI. Bignoniaceae*. Porto Alegre: Gráfica UFRGS, 1965.
- SCHWAAB, S.B., HARTMANN, A., PFUHLER, S., SPEIT, G. The in vivo comet assay: use and status in genotoxicity testing. *Mutagenesis*, v.20, p.245-254, 2005.
- SCOGIN, R. Anthocyanins of the bignoniaceae. *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 8, p. 273-276, 1980.
- SEIFRIED, H.E., ANDERSON, D.E., FISHER, E.I., MILNER, J.A. A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. *Journal of Nutritional Biochemistry*, v. 18(9), p.567-579, 2007.
- SILVA, E.M., SOUZA, J.N.S., ROGEZ, H., REES, J.F., LARONDELLE, Y. Antioxidant activities and polyphenolic contents of fifteen selected plant species from Amazonian region. *Food Chemistry*, v.101, p.1012-1018, 2007.

- SIMÕES, C. M. O., SCHENKEL, E.P., GOSMANN, G., MELLO, J.C.P., MENTZ, L.A., PETROVICK, P.R. *Farmacognosia da planta ao medicamento*. 2 ed. Porto Alegre: Ed Universidade UFRGS, 2000.
- SOEJARTO, D.D. Biodiversity prospecting and benefit sharing perspective from the field. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 51, p.1-5, 1996.
- SPADA, P.K.W.D.S.; DA SILVA, C.O. *Antioxidantes não Enzimáticos*. In: SALVADOR, M., HENRIQUES, J.A.P. (Org). *Radicais Livres e a resposta Celular ao Estresse Oxidativo*. Canoas: Ulbra, p. 51-68, 2004.
- SZETO, Y.T.; COLLINS, A.R., BENZIE, I.F.F. Effects of dietary antioxidants on DNA damage in lysed cells using a modified comet assay procedure. *Mutation Research*, v. 500, p.31-38, 2002.
- TAKEMURA, O.S. *M.SC Thesis*. Departamento de Botânica, S.C.B, Universidade do Paraná, Curitiba, Brasil, 1993.
- TAKEMURA, O.S., IINUMA, M., TOSA, H., MIGUEL, O.G., MOREIRA, E.A., NOZAWA, Y. A Flavone from leaves of *Arrabidaea chica f. cuprea*. *Phytochemistry*, v.38, p.1299-1300, 1995
- TICE, R.R., AGURELL, E., ANDERSON, D., BURLINSON, B., HARTMANN, A., KOBAYASHI, Y. et al. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, v.35, p.206-221, 2000.
- TWEATS, D.J., BLAKEY, D., HELFICH, R.H., JACOBS, A., JACOBSEN, S.D., MORITA, T., NOHMI, T., DONOVAN, M.R.O., SASAKI, Y.F., SOFUNI, T., TICE, R. Report of the IWGT working group on strategy interpretation for regulatory in vivo tests. II Identification of in vivo-only positive compounds in bone marrow micronucleus test. *Mutation Research*. v.627, p.92-105, 2007.
- VARGAS, V.M.F., MOTTA, V.E.P., LEITÃO, A.C., HENRIQUES, J.A.P. Mutagenic and genotoxic effects of aqueous extracts of *Achyroline satureoides* in prokaryotic organisms. *Mutation Research*, p.1-6, 1989.
- VILLELA, I.V., LAU, A., SILVEIRA, J., PRÁ, D., ROLLA, H.C., SILVEIRA, J.D. *Bioensaios para monitoramento de genotoxicidade ambiental*. In: DA SILVA, J., ERDTMANN, B., HENRIQUES, J.A.P. (Org). *Genética Toxicológica*. Porto Alegre: Alcance, p. 147-166, 2003.

www.anvisa.gov.br acessado em 03/11/2005.

www.inova.unicamp.br acessado em 26/12/2006.

- YUNES, R. PEDROSA, R.C., FILHO, V.C. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos do Brasil. *Química Nova*, v.24, p.147-152, 2001.
- WANG, H. NAIR, M.G., STRASBURG, G.M. Antioxidant and antiinflammatory activities of anthocyanins and their aglycon, cyaniding from tart cherries. *Journal of Natural Products*. v.62, p. 294-296, 1999.
- WEI, Q. Y., ZHOU B., CAI Y. J., YANG L., LIU, Z. L. Synergistic effect of green tea polyphenols with trolox on free radical-induced oxidative DNA damage. *Food Chemistry* , v.96, p. 90-95, 2005.
- WIKLUND, S. J., AGURELL, E. Aspects of design and statistical analysis in the Comet assay. *Mutagenesis*, v.18, p.167-175, 2003.
- WITTE, I., PLAPPERT, U., WALL, H., HARTMANN, A. Genetic toxicity assessment: Employing the best science for human safety evaluation part III: The comet assay as an alternative to in vitro clastogenicity tests for early drug candidate selection. *Toxicological Sciences*, v.97, p.21-26, 2007.
- ZORN, B., GARCIA-PIÑERES, A. J., CASTRO, V., MURILLO, R., MORA, G., MERFORT, I. 3-Desoxyanthocyanidins from *Arrabidaea chica*. *Phytochemistry*, v.56, p.831-835, 2001.

8. PERSPECTIVAS

Outros testes serão realizados para complementar o estudo da planta *A. chica*:

1. Avaliação de parâmetros oxidativos através do teste da atividade da catalase e TBARS em amostras de sangue e fígado de camundongos tratados com o extrato bruto e frações de *A. chica*, (resultados parciais em anexo).

2. Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) em córtex cerebral de camundongos realizando o mesmo tratamento de 3 dias com extrato bruto e frações da planta.

3. Avaliação comportamental através da esquiva inibitória para análise da memória de curta e longa duração, (resultados parciais em anexo)

4. Teste cometa *in vivo* para avaliação da atividade genotóxica e antigenotóxica em córtex cerebral (resultados parciais em anexo).

9. ANEXOS

Os animais (machos e fêmeas) foram tratados por 3 dias com o extrato bruto e frações de *A.chica*. Para os testes de avaliação de parâmetros oxidativos (Catalase e TBARS) foram coletadas amostras de sangue e fígado ao final do período experimental. Amostras de córtex cerebral foram utilizadas para o teste cometa e atividade da SOD, ao final do tratamento, no 4º dia. E a avaliação comportamental da esQUIVA inibitória foi realizada no 3º dia e 4º dia de experimento, após administração da última dose dos extratos.

9.1 Catalase

A figura 15 mostra que houve aumento significativo da atividade da catalase em amostras de sangue de fêmeas tratadas com a fração aquosa 1000 mg/Kg/dia. Para os demais extratos não foi observado efeito significativo sobre a atividade da catalase.

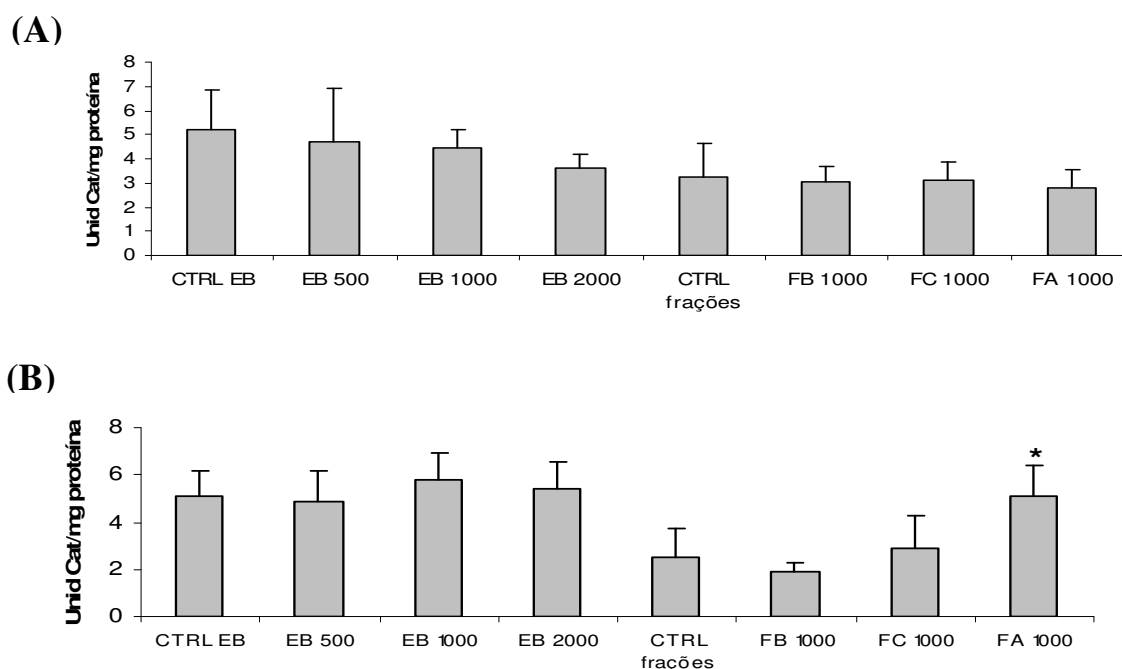
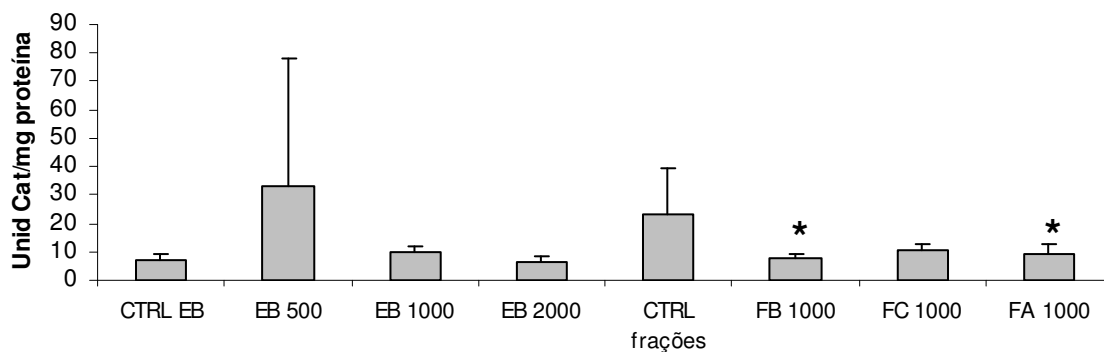


Figura 15. Avaliação da atividade da catalase em camundongos tratados por 3 dias com os extratos de *A. chica*. (A) Sangue de camundongos machos (B) Sangue de camundongos fêmeas; CTRL EB e frações (controle NaCl 0,9%) EB (extrato bruto nas dose de 500 mg/Kg/dia; 1000 mg/Kg/dia e 2000 mg/Kg/dia); FB 1000 (fração butanólica 1000 mg/Kg/dia); FC 1000 (fração clorofórmica 1000 mg/Kg/dia); FA 1000 (fração aquosa 1000 mg/Kg/dia) * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$.

Foi observado efeito significativo sobre a atividade da catalase de homogenizado de fígado de camundongos machos tratados com as frações butanólica e aquosa, sendo que o mesmo não foi observado em outros extratos (Figura 16).

(A)



(B)

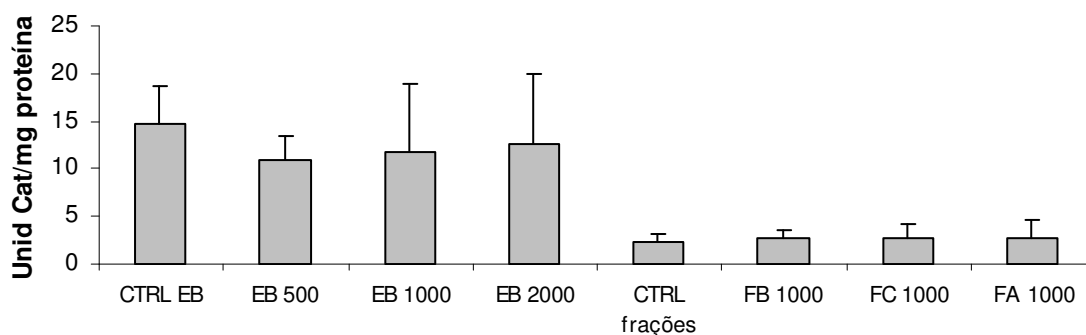
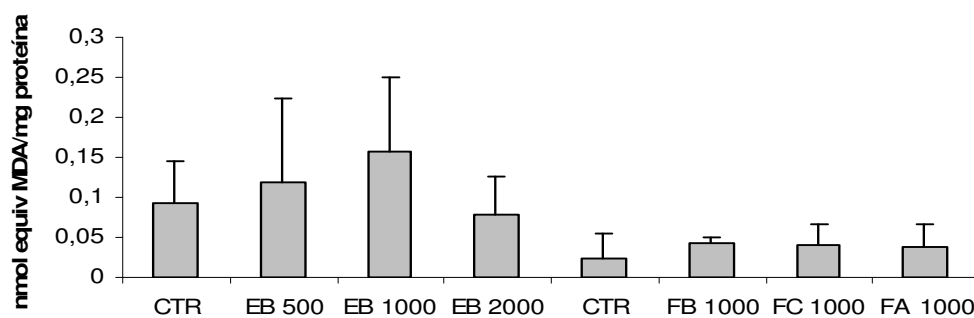


Figura 16. Avaliação da atividade da catalase em camundongos tratados por 3 dias com os extratos de *A. chica*. (A) Fígado de camundongos machos (B) Fígado de Camundongos Fêmeas; CTRL EB e frações (controle NaCl 0,9%) EB (extrato bruto nas dose de 500 mg/Kg/dia; 1000 mg/Kg/dia e 2000 mg/Kg/dia); FB 1000 (fração butanólica 1000 mg/Kg/dia); FC 1000 (fração clorofórmica 1000 mg/Kg/dia); FA 1000(fração aquosa 1000 mg/Kg/dia) * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$.

9.2 Teste TBARS

Conforme figura 17, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos controle e os extratos em ambos os sexos na avaliação da peroxidação lipídica em plasma de camundongos.

(A)



(B)

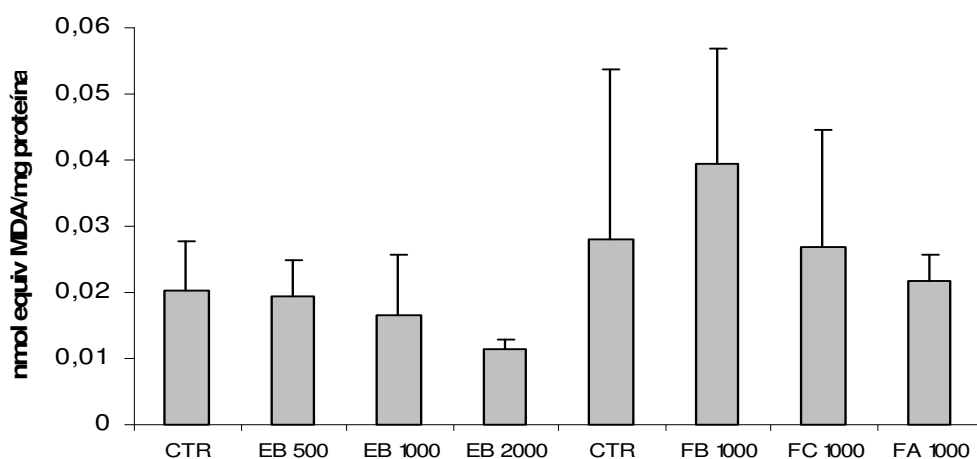
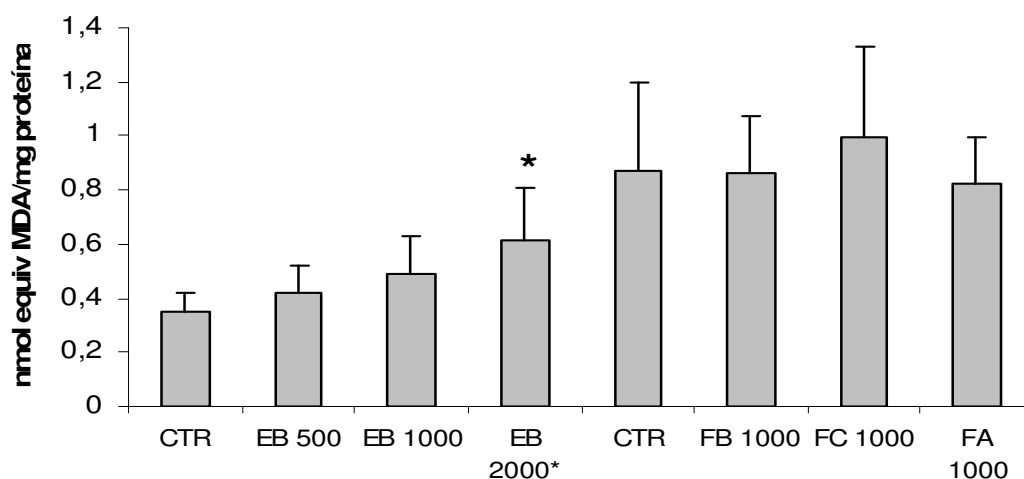


Figura 17. Avaliação da peroxidação lipídica através do teste TBARS em camundongos tratados por 3 dias com os extratos de *A. chica*. (A) Plasma de camundongos machos (B) Plasma de camundongos fêmeas; CTR (controle - NaCl 0,9%) EB (extrato bruto nas dose de 500 mg/Kg/dia; 1000 mg/Kg/dia e 2000 mg/Kg/dia); FB 1000 (fração butanólica 1000 mg/Kg/dia); FC 1000 (fração clorofórmica 1000 mg/Kg/dia); FA 1000(fração aquosa 1000 mg/Kg/dia) * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$.

Porém em homogeneizado de fígado de camundongos foi observado aumento na peroxidação lipídica em relação ao grupo controle em machos tratados com o extrato bruto 2000 mg/Kg/dia (Figura 18). Entretanto não houve diferença significativa para os outros extratos (Figura 18).

(A)



(B)

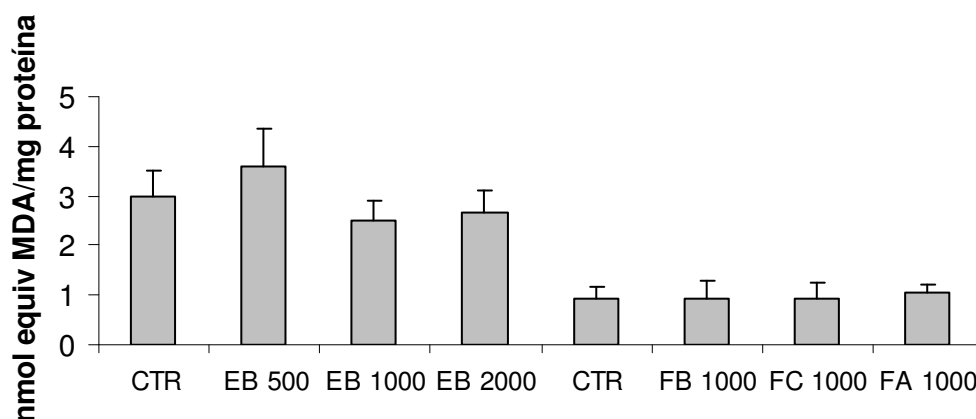


Figura 18. Avaliação da peroxidação lipídica através do teste TBARS em camundongos tratados por 3 dias com os extratos de *A. chica*. (A) Fígado de camundongos machos (B) Fígado de camundongos fêmeas; CTR (controle - NaCl 0,9%) EB (extrato bruto nas dose de 500 mg/Kg/dia; 1000 mg/Kg/dia e 2000 mg/Kg/dia); FB 1000 (fração butanólica 1000 mg/Kg/dia); FC 1000 (fração clorofórmica 1000 mg/Kg/dia); FA 1000(fração aquosa 1000 mg/Kg/dia) * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$.

9.3 Esquiva inibitória

Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo controle, na avaliação comportamental da memória de curta (STM) e longa duração (LTM) para o extrato bruto e frações butanólica, clorofórmica e aquosa de *A. chica* (Figura 19).

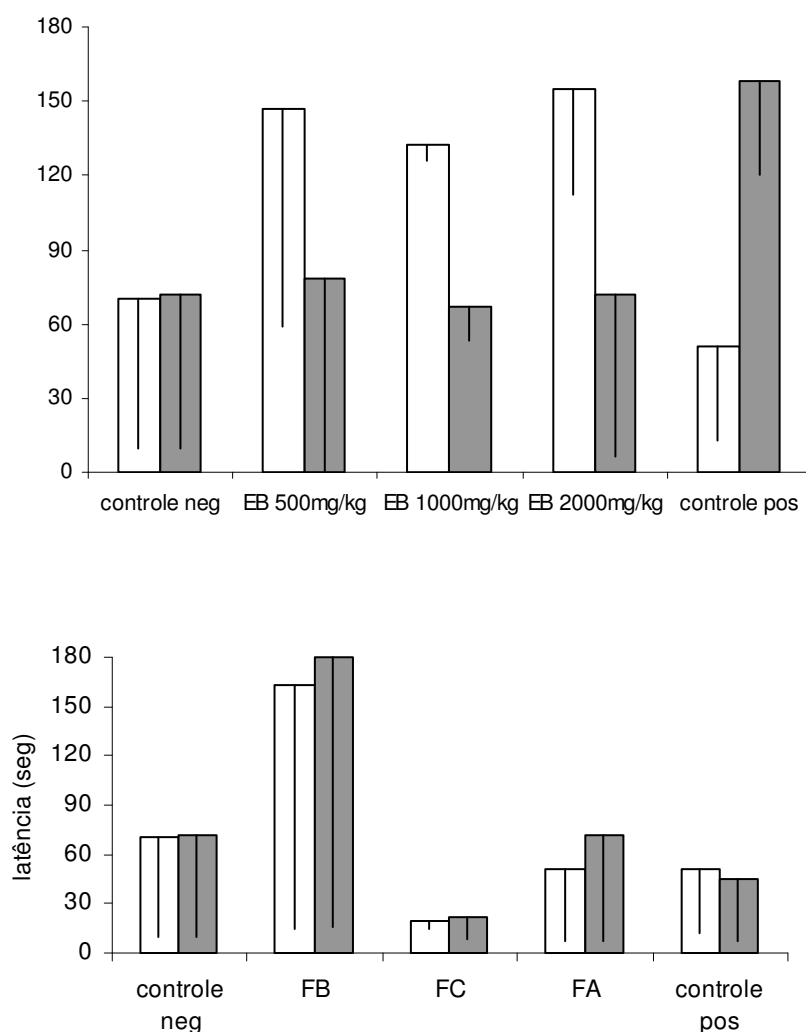


Figura 19. Esquiva inibitória de camundongos tratados com extrato bruto e frações de *A. chica*. Coluna em branco (STM – memória de curta duração, após 1 hora da administração da terceira dose dos extratos); Coluna em cinza (LTM – memória de longa duração – após 24 horas da administração da terceira dose dos extratos). Controle neg (controle - NaCl 0,9%); controle pos (controle - NaCl 0,9%); EB (extrato bruto nas dose de 500 mg/Kg/dia; 1000 mg/Kg/dia e 2000 mg/Kg/dia); FB 1000 (fração butanólica 1000 mg/Kg/dia); FC 1000 (fração clorofórmica 1000 mg/Kg/dia); FA 1000 (fração aquosa 1000 mg/Kg/dia).

9.4 Teste Cometa *in vivo*

Foi observado aumento da FD em córtex cerebral de camundongos machos tratados com o extrato bruto nas 3 concentrações e em fêmeas aumento do ID nas frações clorofórmica e aquosa (Tabela 11). Estes resultados demonstram danos ao DNA induzidos pelo extrato bruto e frações clorofórmica e aquosa. Os resultados parciais obtidos para a atividade antigenotóxica, mostram que a FA protegeu o DNA contra danos induzidos pelo peróxido de hidrogênio em amostras de córtex cerebral de fêmeas.

Tabela 11. Teste cometa em córtex cerebral de camundongos tratados com 3 doses dos extratos de *A. chica*

ID	GENOTOXICIDADE		ANTIGENOTOXICIDADE	
	MACHOS	FÊMEAS	MACHOS	FÊMEAS
GRUPOS				
CONTROLE EB ^a	23,25 ± 21,24		58,7 ± 39,72	
EB 3x 500 ^b	42,78 ± 21,87		84,7 ± 12,81	
EB 3x 1000 ^c	56,17 ± 27,69		98 ± 37,22	
EB 3x 2000 ^d	50,12 ± 32,88		84,57 ± 38,79	
CONTROLE FR ^a		70,5 ± 70,02		144,2 ± 64,02
FB 3x 1000 ^e		37,5 ± 34,5		108,5 ± 45,24
FC 3x 1000 ^f		11,9 ± 6,77**		95 ± 50,8
FA 3x 1000 ^g		14,7 ± 11,47**		65,7 ± 28,43**
FD				
GRUPOS				
CONTROLE EB ^a	8,12 ± 8,6		28,7 ± 18,47	
EB 3x 500 ^b	21,33 ± 10,6*		42,4 ± 11,93	
EB 3x 1000 ^c	22,16 ± 9,04*		42,83 ± 16,03	
EB 3x 2000 ^d	21,12 ± 10,02*		37,43 ± 17,29	
CONTROLE FR ^a		28,3 ± 28,49		51,5 ± 22,55
FB 3x 1000 ^e		16,5 ± 13,4		40,25 ± 13,73
FC 3x 1000 ^f		7,2 ± 2,94*		36,33 ± 14,39
FA 3x 1000 ^g		7,7 ± 4,42*		26,3 ± 10,85**

■ Teste ainda não realizado

^aControle EB: controle extrato bruto – solução salina 0,9% + H₂O₂ (0,20 mM).

^aControle FR: controle frações – solução salina 0,9% + H₂O₂ (0,20 mM).

^bEB 3x 500 (extrato bruto na dose de 500 mg/Kg/dia por 3 dias); ^cEB 3x 1000 (extrato bruto na dose de 1000 mg/Kg/dia por 3 dias); ^dEB 3x 2000 (extrato bruto na dose de 2000 mg/Kg/dia por 3 dias); ^eFB 3x 1000 (fração butanólica na dose de 1000 mg/Kg/dia por 3 dias); ^fFC 3x 1000 (fração clorofórmica na dose de 1000 mg/Kg/dia por 3 dias); ^gFA 3x 1000 (fração aquosa na dose de 1000 mg/Kg/dia por 3 dias) (Resultados – média ± desvio padrão).

^hI%: porcentagem de inibição do ID = [ID do H₂O₂ – ID do extrato com H₂O₂] / [ID do H₂O₂ – ID do controle negativo] x 100.

Amostras de córtex cerebral em camundongos machos e fêmeas no sacrifício (24 horas após aplicação da última dose dos extratos).

ID: Índice de dano – de zero (sem dano, 100 células X 0) a 400 (com máximo de dano, 100 X 4).

FD: Frequência de dano – calculada baseada no número de células com dano versus aquelas sem dano.

*p ≤ 0,05 ; ** p ≤ 0,01.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)