

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



**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES GENOTÓXICAS E
ANTIGENOTÓXICAS DO EXTRATO AQUOSO DE *Baccharis
dracunculifolia* E *Baccharis trimera* EM CAMUNDONGOS**

Dissertação / Tese para obtenção
do Título de Mestre / Doutor em
Genética e Toxicologia Aplicada

CARMEM REGINE FALEIRO RODRIGUES

Orientador: Dr. Alexandre Ferraz

Co-orientador (a): Dra. Jaqueline Nascimento Picada

CANOAS
2008

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Este trabalho foi desenvolvido nas instalações dos laboratórios de Genética Toxicológica da Universidade Luterana do Brasil (ULBRA) Canoas/RS, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Jaqueline N. Picada no (Sala 401, prédio 19), Laboratório de Fitoquímica (sala 416, prédio 19) sob responsabilidade do Prof.Dr. Alexandre Ferraz, e Laboratório de Estudos Farmacocinéticos (salas 15 e 16, prédio 22) sob a responsabilidade do Prof. Dr. Marc François Richter.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Alexandre Ferraz por sua orientação e apoio em cada etapa deste trabalho.

A professora Dra. Jaqueline N. Picada pelo apoio na realização deste trabalho.

Ao professor Dr. Marc Richter pela colaboração nos testes e apoio durante a redação desse trabalho.

A todos os professores e funcionários que de uma maneira ou de outra apoiaram a realização desse projeto.

A bolsista Jacqueline H. Dias pela participação em todas as etapas deste projeto e principalmente pela lealdade, competência e responsabilidade demonstradas durante a execução de cada tarefa solicitada.

Aos bolsistas e colegas do laboratório 401, pela indispensável ajuda na realização desse trabalho.

Agradeço, principalmente, a minha família, pelo apoio, compreensão e incentivo na realização de mais esse objetivo.

Muito obrigada!

ÍNDICE

RESUMO	6
ABSTRACT	7
I- INTRODUÇÃO	8
1. Aspectos taxonômicos	9
1.1. Família Asteraceae.....	9
1.2. Gênero <i>Baccharis</i>	10
1.2. <i>Baccharis dracunculifolia</i>	12
1.2.1. Descrição Botânica.....	12
1.2.2. Aspectos fitoquímicos e propriedades biológicas.....	13
1.2.2.1. PRÓPOLIS.....	13
1.2.2.2. Óleo Volátil.....	16
1.2.2.3. Flavonóides.....	17
1.2.2.4. Outros Compostos.....	18
1.3. <i>Baccharis trimera</i>	19
1.3.1. Descrição Botânica.....	19
1.3.2. Aspectos fitoquímicos e propriedades biológicas.....	20
1.3.2.1. Flavonóides.....	20
1.3.2.2. Diterpenos.....	22
1.3.2.3. Uso popular.....	23
1.4. Ensaio para avaliação do potencial genotóxico e mutagênico	24
1.4.1. Ensaio Cometa.....	24
1.4.2. Teste de micronúcleo em medula óssea de camundongos.....	26
1.5. Teste para avaliação do potencial antioxidante	27
1.5.1. Teste hipoxantina/xantina oxidase e DPPH.....	28

II- OBJETIVOS.....	30
1. Objetivo geral.....	30
1.2. Objetivos específicos.....	30
III – ARTIGOS.....	31
1. “Mutagenic and genotoxic effects of <i>Baccharis dracunculifolia</i> DC”.	
2. “Genotoxic and antigenotoxic properties of <i>Baccharis trimera</i> in mice”.	
IV – DISCUSSÃO GERAL.....	71
V- CONCLUSÃO.....	77
VI - PERSPECTIVAS.....	78
VII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	79

RESUMO

Baccharis dracunculifolia e *Baccharis trimera* pertencem a família Asteraceae. Popularmente conhecidas como “carqueja” estas espécies são empregadas na forma de chá para tratar distúrbios digestivos e hepáticos, sendo também indicadas para desintoxicação do organismo. Neste estudo foi avaliado o perfil fitoquímico, efeitos mutagênicos, bem como, atividades genotóxicas e ou antígenotóxica e atividades antioxidantes dos extratos aquosos de ambas espécies. A análise fitoquímica de ambas as plantas indicou a presença de saponinas e flavonóides. Na avaliação genotóxica através do ensaio cometa *in vivo* o extrato aquoso de *B. dracunculifolia* (EA-d) induziu danos ao DNA em amostras de tecidos sangüíneo e hepático de camundongos. Entretanto, foi observado reparo do dano na amostra de sangue periférico (SP) 24h, em relação ao controle negativo (CN). No teste de micronúcleos EA-d foi mutagênica (500-2000 mg/kg) e citotóxica (2000 mg), em relação ao controle negativo (CN). O extrato aquoso de EA-t induziu danos ao DNA das células de SP coletados em 3h, de forma dose e efeito. Porém foi observado reparo de dano em amostra de SP 24h em relação ao CN. No tratamento *ex vivo* com H₂O₂ observou-se diminuição do ID nas amostras de SP 72h (500-1000 mg/kg). Os resultados da avaliação da atividade mutagênica indicaram que EA-t aumentou a frequência de micronúcleos em eritrócitos policromáticos de medula óssea de animais tratados, quando comparados ao CN. No teste hipoxantina/xantina oxidase e DPPH *in vitro*, ambos extratos demonstraram atividades antioxidantes de forma dose e efeito. No ensaio de DPPH ambos os extratos demonstraram atividade de 90% (1000 µg/ml) sob os radicais livres e de 70% de inibição na formação de DHBA no ensaio de hipoxantina/xantina oxidase.

ABSTRACT

Baccharis dracunculifolia and *B. trimera* belong to the Asteraceae family, popularly known as “carqueja” both plants are frequently used as a tea to treat digestive and hepatic disorders, also being indicated to detox the organism. In the present work the phytochemical profile was analysed and evaluated the mutagenic effect, as well as genotoxic/antigenotoxic and antioxidant activities of the aqueous extract of *B. trimera* and *Baccharis dracunculifolia*. The phytochemical analysis of both plants indicated the presence of saponins and flavonoids. The genotoxic evaluation using the comet test showed that *B. dracunculifolia* aqueous extract (EA-d) induced DNA damage in mice blood and hepatic tissue. However damage repair in peripheral blood (PB) after 24h was observed compared with the NC (negative control). In the micronucleus test, EA-d was mutagenic (500-2000 mg/kg) and cytotoxic (2000 mg), when compared to NC. *Baccharis trimera* aqueous extract (EA-t) induced DNA damage in dose-dependent manner on PB collected after 3h. The number of micronucleus in PCES of treated animals Bone marrow, when compared to the NC indicated mutagenic effect for EA-t. The antioxidant activity results of DPPH and hipoxanthine/xanthine oxidase assay showed for both extracts a concentration-dependent activity. In the DPPH assay, the free radical scavenging activity of both extracts was higher than 90% at 1000 µg/ml, and the capacity to inhibit DHBA formation using the hipoxanthine/xanthine oxidase assay was higher than 70%.

I - INTRODUÇÃO

O uso de plantas medicinais pelo homem está associado a sua evolução antropológica, desde quando era nômade até tornar-se um espécime sedentário. Através da observação, experimentação e da necessidade de tratar seus males o homem fez uso das mais variadas espécies de plantas selecionando-as de acordo com seu potencial terapêutico (SIMÕES *et al.*, 1986). Ao longo deste tempo, esse conhecimento, tornou-se uma das maiores riquezas terapêuticas, produzindo um legado e propiciando o aproveitamento dessas plantas pela etnofarmacologia. Esta ciência é definida como “a exploração científica interdisciplinar dos agentes biologicamente ativos, tradicionalmente empregados ou observados pelo homem” (BRUHN e HOLMSTEDT, 1982; SIMÕES *et al.*, 1999). A partir do conhecimento popular sobre plantas medicinais e o fácil acesso a nossa vasta biodiversidade, estima-se que os custos para o desenvolvimento de um fitomedicamento não devem ultrapassar 2 a 3% daquele previsto para o desenvolvimento de um novo medicamento sintético (CALIXTO, 2000). Entretanto, cabe salientar que a exploração indiscriminada dos recursos naturais pode levar a extinção de muitas espécies (SOULÉ, 1991) como é o caso de alguns gêneros ameaçados *Maytenus*, *Bauhinia*, *Mikania*, *Cordia*, *Tabebuia*, *Pilocarpus Erytroxylum* (DE STASI, 2003).

O Brasil possui a maior biodiversidade do mundo em recursos naturais, estimada em cerca de 20% do número total de espécies, contando com mais de 55.000 espécies de plantas catalogadas (SIMÕES *et al.*, 1989; DIAS, 1996; SIMÕES *et al.*, 2003). Este imenso patrimônio genético, já escasso nos países desenvolvidos, tem valor inestimável, principalmente, no desenvolvimento de novos fármacos (CRAGG *et al.*, 1997; PANDEY, 1998; SHU, 1998). Tal fato justifica o grande número de fármacos obtidos a partir do metabolismo secundário de várias espécies de plantas, como por exemplo quinina (*Cinchona ledgeriana*), paclitaxel (*Taxus brevifolia*), digoxina (*Digitalis purpurea*) e morfina (*Papaver somniferum*) (SIMÕES *et al.*, 2003).

Outro emprego importante das plantas medicinais refere-se a produção de fitoterápicos, que são medicamentos constituídos de extratos padronizados de plantas, amplamente comercializados, tanto em países pobres como em países ricos (LORENZI *et*

al., 2002). Os fitoterápicos são reconhecidos pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como recurso terapêutico desde 1978. Desde então o consumo destes fitoterápicos tem se intensificado (LOPES *et al.*, 2004; ROSA *et al.*, 2004). A legislação brasileira e internacional exige que produtos industrializados como pesticidas, agrotóxicos, fármacos, fitoterápicos entre outros, sejam produzidos ou colocados no mercado para consumo somente após a avaliação rigorosa de suas características. A Portaria nº 116 de 1996 normatizou o estudo de toxicidade e eficácia dos fitoterápicos, exigindo que estes produtos sejam submetidos a uma extensa bateria de testes. Estes ensaios são realizados para determinar suas propriedades físico-químicas, atividade tóxica e neurotóxica em animais, assim como seu potencial mutagênico, teratogênico e carcinogênico. No intuito de padronizar as análises toxicológicas, a ANVISA emitiu sob forma de Resolução (RE Nº. 90 de 2004) o “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 (LEMOS e TERRA, 2003; www.anvisa.gov.br). Dessa maneira, constata-se a importância de estudos quanto à toxicidade de plantas medicinais, bem como a determinação do potencial farmacológico para a pesquisa de novos produtos naturais mais eficazes e seguros.

1. Aspectos taxonômicos

1.1. Família Asteraceae

Asteraceae é o grupo sistemático mais numeroso dentro das Angiospermas, compreendendo cerca de 1.100 gêneros e 25.000 espécies. São plantas de aspecto extremamente variado, incluindo pequenas ervas ou arbustos (VERDI *et al.*, 2005) cerca de 98% do gênero é constituído por plantas de pequeno porte, que são encontradas em todos os tipos de habitat, principalmente nas regiões tropicais e montanhosas da América do Sul (JOLY, 1967). Plantas dessa família são extensivamente estudadas quanto a sua composição química, atividade biológica em função do seu uso popular como recurso terapêutico. Este é o caso de *Artemisia absinthium*, erva de sabor amargo, conhecida popularmente como losna, com benéficas funções digestivas, usada também na fabricação

da bebida absinto (JOLY, 1967; VERDI *et al.*, 2005). Estudos científicos realizados com espécies de Asteraceae levaram ao isolamento de uma variedade de metabólitos secundários com destaque aos flavonóides, que despertaram o interesse dos pesquisadores devido sua atividade como antioxidante (HARBORNE *et al.*, 2000).

1.2. Gênero *Baccharis*

Com mais de 500 representantes, *Baccharis* é um dos gêneros mais numerosos pertencentes à família Asteraceae, que se distribuí por todo o sul do Brasil, Argentina, Colômbia, Chile e México. No Brasil são descritas 120 espécies de *Baccharis* e a maior parte está localizada na região sudeste do país (CORRÊA, 1984; VERDI *et al.*, 2005).

Em geral, são arbustos que crescem em média de 0,5m a 4m de altura. As espécies desse gênero apresentam elevado valor sócio-econômico, com ampla dispersão nos Estados de Santa Catarina, Paraná, São Paulo e Rio Grande do Sul. As espécies desse gênero são consumidas, principalmente na forma de chás, com indicações para distúrbios estomacais, fígado, anemias, inflamações, diabetes, sendo também indicada no processo de desintoxicação do organismo (CORREA, 1984; KOBES, 1995). Por outro lado, muitas são as implicações econômicas dessas espécies, no sudeste dos Estados Unidos. *Baccharis neglecta*, *B. halimifolia* e *B. salicifolia* causam impactos negativos para a economia americana. *B. neglecta* é uma planta invasiva, afetando as pastagens em algumas regiões do Texas, enquanto *B. halimifolia* é tóxica para o gado, causando sintomas como tontura, tremores, convulsão, diarreia e outros transtornos gastrintestinais. *B. salicifolia* é freatófita, provocando o esgotamento dos lençóis freáticos, principalmente em regiões muito áridas (BOLDT, 1989).

Em pastagens brasileiras têm-se registros de envenenamento de animais devido à ingestão de *B. megapotamica* e *B. coridifolia*, espécies que acumulam tricotecnos, substâncias altamente tóxicas (VARASCHIN *et al.*, 1998; HARAGUCHI, 2003; VERDI *et al.*, 2005), podendo causar a morte tanto de animais como de seres humanos (ROZZA *et al.*, 2006). *B. coridifolia* conhecida popularmente com "mio-mio" tornou-se um problema

freqüente na América do Sul, sendo uma das plantas mais tóxicas para o gado no Brasil, Argentina e Uruguai. A ingestão 0,25 g a 0,50 g da planta por kg do animal, quando estas estão com flores, ou 2 g/kg de talos da planta em crescimento é suficiente para levar à morte dentro de 14 a 48 h (VERDI *et al.*, 2005; ROZZA *et al.*, 2006). Por outro lado, algumas espécies desse gênero trazem benefícios, como é o caso de *B. pluralis* bastante utilizada na delimitação de terrenos na forma de cerca viva e na cobertura de solo para prevenir erosão. A partir das folhas da *B. dracunculifolia*, *B. genistelloides* e *B. trimera* do sudeste do Brasil são extraídos, por arraste a vapor, óleo de “vassoura” e óleo de “carqueja”, com alto valor para a indústria de fragrância (DE STASI e HIRUMA LIMA, 2002; KUMAZAWA *et al.*, 2004). Além disso, essas espécies e outras do gênero *Baccharis*, tem despertado o interesse dos pesquisadores devido sua importância farmacológica no uso popular para tratar distúrbios digestivo e disfunção hepático (VARASCHIN *et al.*, 1998; HARAGUCHI, 2003; JANUÁRIO *et al.*, 2004; KUMAZAWA *et al.*, 2004; VERDI *et al.*, 2005; OLIVEIRA *et al.*, 2005; ALENCAR *et al.*, 2005; ORSI *et al.*, 2005; FUKUDA *et al.*, 2006).

Estudos fitoquímicos com várias espécies do gênero *Baccharis* revelam a presença de diferentes classes como: triterpenos, diterpenos, sesquiterpenos (MOREIRA *et al.*, 2003; ORSI *et al.*, 2005), taninos, saponinas (GENE *et al.*, 1996; BUDEL *et al.*, 2004) e tricotecenos (RIZZO *et al.*, 1997; VERDI *et al.*, 2005). Além destes, cabe destacar a freqüente ocorrência de flavonóides, com distintos tipos de núcleos como: flavanonas naringenina e eriodictiol (SHARP *et al.*, 2001); flavanonóis aromadendrina (MOREIRA *et al.*, 2003) cirsimaritina (MESQUITA *et al.*, 1986); flavonas apigenina, hispidulina, quercetina, penduletina (SHARP *et al.*, 2001) luteolina (SOICKE *et al.*, 1987), flavonóis canferol (SHARP *et al.*, 2001), glicosídeos rutina, hiperosideo e isoquercetrina (LIU *et al.*, 1993).

Nos estudos de atividades biológicas com espécies do gênero, destacam-se os efeitos antimicrobianos (AVANCINI *et al.*, 2000), antioxidante (RESENDE *et al.*, 2007), citotóxicos (VERDI *et al.*, 2005, FUKUDA *et al.*, 2006), antimutagênico (NAKASUGI e KOMAI, 1998) e antiinflamatórios (JANUÁRIO *et al.*, 2004). Entre as espécies mais pesquisadas quanto à composição química e/ou atividade biológica, encontra-se *B.*

megapotamica, *B. incarum*, *B. trimera*, *B. trinervis*, *B. salicifolia*, *B. crispa*, *B. coridifolia*, *B. dracunculifolia*, *B. grisebachii* e *B. tricuneata* (VERDI *et al.*, 2005).

1.2. *Baccharis dracunculifolia*

1.2.1. Descrição Botânica

Baccharis dracunculifolia (Figura 1 e 2) se distribui por todo sul do Brasil, Bolívia, Paraguai, Uruguai e norte da Argentina. É um arbusto perene, não ramificado, cresce de 1,5 a 5m de altura e se desenvolve em ambientes úmidos. Apresenta folhas lanceoladas, alternas, inteiras e denteadas na parte superior. Sua floração (Figura 2) ocorre no verão com formação de numerosos capítulos pedunculados, solitários formados nas axilas das folhas superiores. Seu fruto é do tipo aquênio cilíndrico (BURKARTA, 1974).



Figura 1. Vista geral da planta *B.dracunculifolia* (<http://plantamatriz.com.br>).

Conhecida como "alecrim-do-campo", "vassourinha" ou "carqueja", *B. dracunculifolia* é popularmente empregada na forma de chá como antipirético, para tratar distúrbios digestivos e hepáticos (VERDI *et al.*, 2005; FUKUDA *et al.*, 2006). Esta planta é uma das espécies do gênero que despertou o interesse de pesquisadores, devido ao seu amplo uso popular, as propriedades farmacológicas associadas aos seus constituintes químicos, como a própolis verde e o óleo essencial (DE STASI e HIRUMA LIMA, 2002; VERDI *et al.*, 2005; ALENCAR *et al.*, 2005).



Figura 2. *B. dracunculifolia* em floração (<http://plantamatriz.com.br>)

1.2.2. Aspectos fitoquímicos e propriedades biológicas

1.2.2.1. PRÓPOLIS

A própolis é um termo genérico usado para descrever uma mistura resinosa coletada por abelhas da espécie *Apis mellifera* (Figura 3) de diversas partes da planta como gemas vegetativas, gemas florais e exsudados resinosos (GHISALBERTI, 1979; TEIXEIRA *et al.*, 2005) produzidos na região sudeste do Brasil (ALENCAR *et al.*, 2005).



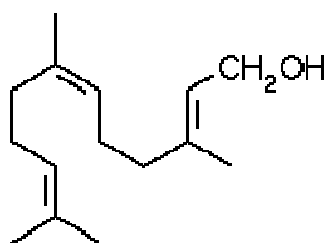
Figura 3. *Apis mellifera* coletando a própolis (ponta da seta) de *B. dracunculifolia* (<http://plantamatriz.com.br>).

Estudos comparativos entre a própolis e o extrato de folhas de *Baccharis dracunculifolia* demonstram que essa espécie é a principal fonte para a sua produção (PARK *et al.*, 2002^a, 2002b; KUMAZAWA *et al.*, 2003; PARK *et al.*, 2004). Alencar e colaboradores (2005) através de estudos fitoquímicos da própolis e do extrato metanólico das folhas de *B. dracunculifolia*, constataram que os compostos fenólicos, principalmente, artepilin C e derivados do ácido cinâmico estão presente em ambos, o que sugere a origem da própolis verde (MARCUCCI e BANKOVA, 1999; PEREIRA *et al.*, 2002a; PEREIRA *et al.*, 2002b; FUNARI *et al.*, 2007).

O uso popular da própolis como recurso terapêutico é milenar. Povos egípcios usavam a própolis para mumificação e como recurso terapêutico para tratar infecções, edemas e ferimentos. Os gregos, especialmente, Aristóteles já descrevia seu uso medicinal (MATSUNO, 1997; PEREIRA *et al.*, 2002a, 2002b; CASTALDO e CAPASSO, 2002).

Ao longo do tempo, instigado pelo uso popular, o estudo da própolis se destaca por suas várias propriedades biológicas e por sua atividade antibiótica, (MARCUCCI *et al.*, 2001; ORSI *et al.*, 2005), antiinflamatória (MONTPIED *et al.*, 2003), cicatrizante (GHISALBERTI, 1979), anestésica, antiviral (BURDOCK, 1998), antioxidante (DE STASI e HIRUMA LIMA, 2002; KUMAZAWA *et al.*, 2004) e anticariogênica (ISHIKAWA *et al.*, 2004). Esta atividade, também foi verificada por Silva Leitão e colaboradores (2004) a partir de testes *in vitro* utilizando *Streptococcus mutans* e extrato de própolis verde.

Em estudo fitoquímico Alencar e colaboradores (2005) observaram tanto no extrato metanólicos das folhas *B. dracunculifolia* quanto na própolis, desta espécie, a presença do composto farnesol (Figura 4), descrito por alguns pesquisadores como citotóxico (VOZIYAN *et al.*, 1995; ALENCAR *et al.*, 2005; FUKUDA *et al.*, 2006; FUNARI *et al.*, 2007). Funari e colaboradores (2007) através de ensaios *in vitro* utilizando fibroblastos (NIH-3T3) de camundongos, constataram efeito citotóxico da própolis verde na concentração de 31,25 µg/ml. Em outro estudo Pereira e colaboradores (2008) através do Ensaio Cometa e testes de micronúcleos verificaram atividade genotóxica e mutagênica da própolis em células de sangue periférico de camundongos.



Farnesol

Figura 4. Estrutura molecular do farnesol (ALENCAR *et al.*, 2005).

1.2.2.2. ÓLEO VOLÁTIL

Os óleos voláteis são misturas complexas, obtido a partir de plantas, constituídos por substâncias voláteis, lipofílicas, odoríferas e líquidas (SIMÕES e SPITZER, 2003). Estes metabólitos secundários tem como função biológica para o vegetal, inibir a germinação, proteger contra predadores, atrair polinizadores e controlar a temperatura (CRAVEIRO e MACHADO, 1986; HARBONE,1993).

O óleo volátil obtido das folhas de *B. dracunculifolia*, conhecido popularmente como “óleo de vassourinha” tem grande valor econômico para a indústria de fragrância e farmacêutica (DE STASI, 2003; VERDI *et al.*, 2005). Em estudo fitoquímica Loayza e colaboradores (1995) identificaram e caracterizaram no óleo de *B. dracunculifolia* vários compostos sesquiterpênicos oxigenados (Figura 5), tendo como constituintes majoritários germacrano-D (5%) e δ -cadineno (13%).

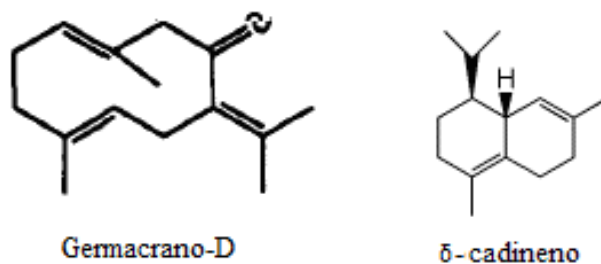


Figura 5. Estrutura molecular dos sesquiterpenos Germacrano-D e δ -cadineno (LOAYZA *et al.*, 1995).

Alencar e colaboradores (2005) utilizando cromatografia gasosa acoplada a um espectrômetro de massas (CG-EM) fizeram análise no extrato metanólico das folhas de *B. dracunculifolia* e identificaram a presença de alfa-pineno, beta pineno, éster dimetílico do ácido butanedióico, éster metílico do ácido hidroxicinâmico, éster etílico do ácido hidroxicinâmico, 7- éster metílico do ácido 4-metoxibenzóico, n-tetradecano, farnesol, metil 4-hidroxi-hidroxicinamato, metil 4-metoxicinamato (ácido cumárico), etil 3,4 dimetoxicinamato (ácido ferrúlico), éster metílico do ácido hexadecanóico, 4-pentametil-6-

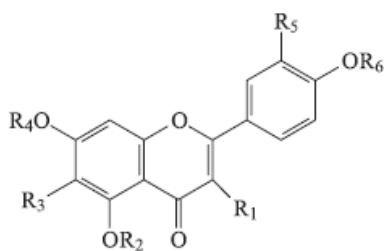
butil-2,3-dihidroindeno, éster metílico do ácido 9,12-octadecadienóico, apigenina, isosacuranetina e canferide.

Nagatani e colaboradores (2001, 2002) identificaram, no extrato metanólico de folhas de *B. dracunculifolia* novos glicosídeos como β -D-glucopiranosose, β -D-apiofuranosil, β -D-glucopiranosose, (*E*)-caffeoil e dracunculifosídeos. Em outro estudo Fukuda e colaboradores (2006) isolaram do extrato das folhas de *B. dracunculifolia*, um novo sesquiterpeno denominado Baccharisketone e um monoterpene, acetato de *p*-metoxitímol.

Em ensaios laboratoriais, com óleo volátil de amostras silvestres de *B. dracunculifolia* têm sido observados distintas propriedades biológicas, como antiinflamatória, antimicrobiana, antimutagênico, antioxidante (DE STASI e HIRUMA LIMA, 2002; KUMAZAWA *et al.*, 2004). Entretanto Fukuda e colaboradores (2006) verificaram que alguns compostos voláteis como timol, carvacrol, *p*-metoxitímol, e *p*-cimeno-2,3-diol, presente em maior concentração nas folhas de *B. dracunculifolia* exerceram atividade inibitória sobre o crescimento de células tumorais (L 1210) *in vitro*, caracterizando assim, uma forte citotoxicidade frente a estas células.

1.2.2.3. FLAVONÓIDES

Juntamente com os diterpenos, os flavonóides são os compostos de maior ocorrência no gênero *Baccharis* (MESQUITA *et al.*, 1986; SOICKE *et al.*, 19987; LIU *et al.*, 1993; SHARP *et al.*, 2001; MOREIRA *et al.*, 2003). Sendo que, deste grupo, a flavona é a classe que ocorre com maior frequência em *B. dracunculifolia* (Figura 6) (MARCUCCI, BANKOVA, 1999; PEREIRA *et al.*, 2002a; PEREIRA *et al.*, 2002b; VERDI *et al.*, 2005; FUNARI *et al.*, 2007).



Flavona

Figura 6. Estrutura molecular das flavonas (VERDI *et al.*, 2005).

1.2.2.4. OUTROS COMPOSTOS

Alguns estudos mostram aplicação biológica tanto dos extratos de *B. dracunculifolia* como dos compostos bioativos isolados. Resende e colaboradores (2007), através do ensaio de micronúcleo, observaram atividade antimutagênica da fração acetato de etila de *B. dracunculifolia* em modelos animais. Além disso, os autores nesse mesmo estudo verificaram, por HPLC a presença de compostos fenólicos como ácido cafêico, ácido p-cumárico, aromadendrin-4'-*O*-metil eter, 3-prenil- ácido p-cumárico (drupanin), 3,5-diprenil- ácido p-cumárico (artepillin C) (Figura 7) e baccharin, que foi associado a atividade antimutagênica observada nesse estudo.

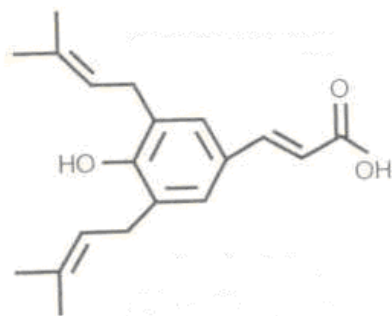


Figura 7. Estrutura molecular do Artepillin C (<http://www.bioessens.com>)

Em outro estudo Silva Leitão e colaboradores (2004) verificaram, em testes *in vitro* atividade antimicrobiana e anticariogênica, da fração clorofórmica das folhas de *B. dracunculifolia* frente a *S. mutans*.

1.3. *Baccharis trimera*

1.3.1. Descrição Botânica

B. trimera (figura 8) é uma espécie nativa nos campos e beiras de matas do sul do Brasil, Bolívia, Uruguai e norte da Argentina. É um arbusto, perene, ramificado, dióico, áfilo, com ramos trialados que se desenvolve em ambientes úmidos atingindo até 1m de altura. Apresentam flores branco-amareladas, reunidas em inflorescências do tipo capítulo, dispostos ao longo do ramo superior, formando espigas (ALICE *et al.*, 1995; BIASI e BONA, 2000).



Figura 8. Vista geral da planta *B.trimera*.

1.3.2. Aspectos fitoquímicos e biológicos

1.3.2.1. Flavonóides

Os flavonóides são compostos produzidos pelo metabolismo secundário das plantas, estes vêm atraindo atenção de pesquisadores seja como substância isolada ou na forma de compostos, devido suas propriedades antioxidante (MARRONI, 2002). Estudos fitoquímicos com as partes aéreas de *B. trimera* revelou a presença de vários constituintes químicos como flavonóides (Figura 9) e terpenos (BOHLMANN e D ZDERO, 1969; HERZ *et al.*, 1977; TORRES *et al.*, 2000).

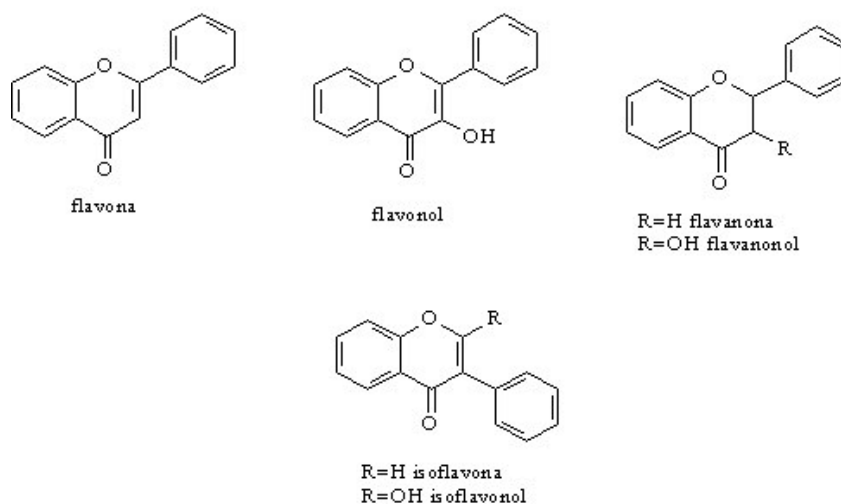


Figura 9. Estrutura básica classes de flavonóides (HEIM *et al.*, 2002).

A partir das partes aéreas de *Baccharis trimera* já foram isolados os flavonóides (Figura10): eupatorina, quercetina, luteolina, nepetina apigenina e hispidulina (SOICKE *et al.*, 1987; SANTOS FILHO *et al.*, 1980). Segundo Torres e colaboradores (2000) o flavonóide eupatorina foi obtido a partir da fração clorofórmica de partes aéreas de *B. trimera*. Em análise quantitativa do teor de flavonóides em partes aéreas de *B. trimera*, Silva e colaboradores (2006) observaram em espécies nativas e silvestres a presença das flavonas como 5,3'-dihidróxi-4',6,7-trimetóxiavona e 5-hidroxi-3',4',6,7-

tetrametóxilflavona, no entanto, há maior concentração das flavonas 5-hidróxi-3',4',6,7-tetrametóxilflavona em espécies silvestres (Figura 11).

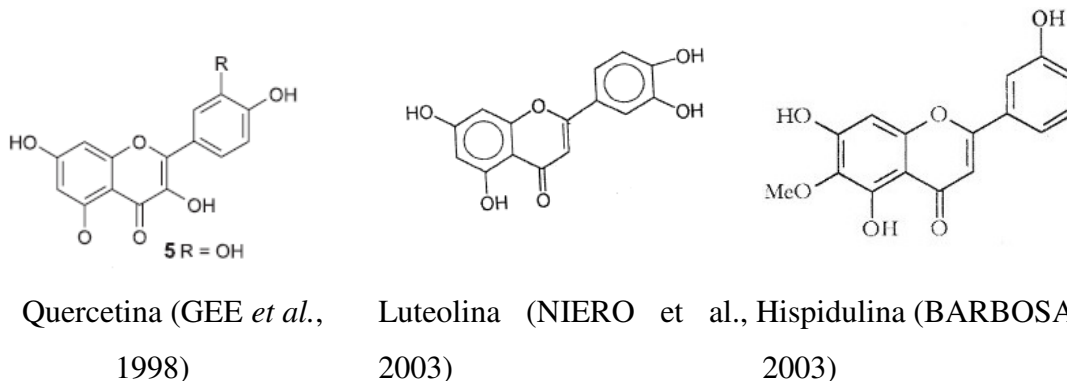


Figura 10. Estrutura molecular da Quercetina, Luteolina e Hispidulina

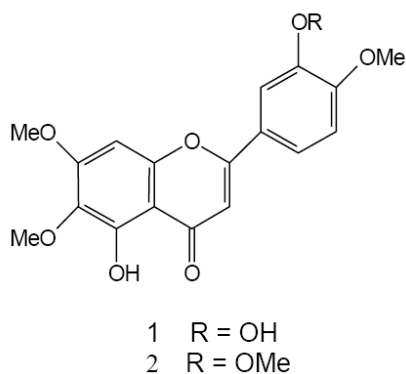


Figura 11. Estruturas das flavonas eupatorina ou 5,3'-diidróxi-4',6,7-trimetóxilflavona (1) e 5-hidroxi-3',4',6,7-tetrametóxilflavona (2) (JANUÁRIO *et al.*, 2006).

Em estudos laboratoriais, os pesquisadores verificam a atividade biológica desses compostos. Em experimento com animais modelos com intoxicação induzida por Phalloidin, Soicke e colaboradores (1987) observaram que o flavonóide hispidulina demonstrou significativa ação hepatoprotetora contra as toxinas do Phalloidin. Posteriormente, essa atividade hepatoprotetora da hispidulina foi também observada em testes *in vitro* por Bruneton (2001). Em outro estudo Nakasugi e Komai (1998),

observaram através do testes de Ames, ação antimutagênica das flavonas presentes no extrato metanólico das partes aéreas de *B. trimera*.

1.3.2.2 Diterpenos

Os diterpenos são os compostos encontrados em maior quantidade no gênero *Baccharis*. Através de estudo com a fração clorofórmica das partes aéreas de *B. trimera* foi possível isolar e identificar um diterpeno do tipo clerodano (Figura 12) (TORRES *et al.*, 2000; VERDI *et al.*, 2005). Essa substância, em ensaios laboratoriais, demonstrou efeitos relaxantes significativos, na musculatura vascular de ratos (TORRES *et al.*, 2000).

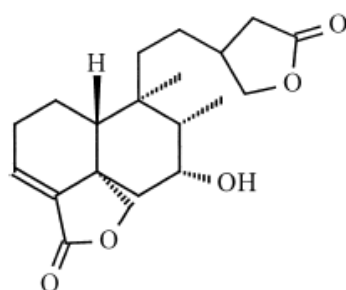


Figura 12. Estrutura química do diterpeno isolado de *B. trimera* (TORRES *et al.*, 2000).

Através de métodos cromatográficos, Januário e colaboradores (2004) isolaram do extrato bruto de *B. trimera* um diterpeno do tipo clerodano que foi identificado por métodos espectroscópicos como sendo o composto 7-hidróxi-3,13-clerodadieno-16,15:18,19-diolido (Figura 13).

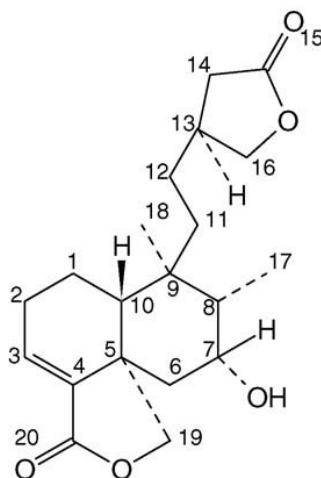


Figura 13. Estrutura química do diterpeno clerodano (JANUÁRIO *et al.*, 2004).

1.3.2.3. Uso popular

Baccharis trimera é conhecida como "carqueja" e "carqueja-amarga", suas partes aéreas são popularmente utilizadas na forma de chá para tratar distúrbios digestivos, hepáticos, reumatismo, diabetes e como antipirético (GENE *et al.*, 1992; ALICE *et al.*, 1995). Esta espécie é estudada devido ao seu amplo uso popular, efeitos terapêuticos, sendo conhecida principalmente, por seus efeitos antiinflamatórios (CORRÊA, 1984; GENE *et al.*, 1992; NAKASUGI e KOMAI, 1998). Essa indicação popular foi avaliada por Gene e colaboradores (1996) em modelos animais com edemas induzidos quimicamente. Neste estudo os autores observaram efeito analgésico (67%) e antiinflamatório (95%) nos animais tratados com extrato bruto de *B. trimera* na dose de 50mg/kg e 100mg/kg e atribuíram estes efeitos a presença de saponinas e flavonóides. Em outro estudo Gamberini e colaboradores (1991) com base no uso popular de *B. trimera* para tratamento de disfunção digestiva, testaram em modelos animais, extratos aquosos de partes aéreas de *B. trimera* e observaram grande diminuição na secreção de ácido gástrico, induzidos por etanol.

Muitas espécies de plantas são usadas popularmente como recurso terapêutico para tratar o diabetes. Além de várias atividades terapêuticas já citadas, *B. trimera* também demonstrou efeitos hipoglicêmicos, observados por Oliveira e colaboradores (2005). Neste trabalho os autores utilizaram modelos animais diabéticos, tratados com extratos de *B. trimera*. O efeito anti-hiperglicêmico foi verificado nas frações etanólica, aquosa e butanólica.

1.4. Ensaio para avaliação do potencial genotóxico e mutagênico

1.4.1. Ensaio Cometa

O potencial genotóxico (ou mutagênico) de substâncias químicas é avaliado em estudos com organismos procarióticos e eucarióticos, através de testes *in vitro* e *in vivo* (VILLELA *et al.*, 2003). Os testes regulatórios de genética toxicológica incluem uma série de bioensaios de mutagenicidade definidos e selecionados para detectar agentes químicos e físicos capazes de induzir mutações ou alterações genéticas em nível de DNA e cromossomos (Da SILVA *et al.*, 2003). Entre os bioensaios mais utilizados para avaliar atividades genotóxicas e mutagênicas estão o ensaio cometa e teste de micronúcleos (MN) (CHOY, 2001; RIBEIRO *et al.*, 2003).

O Ensaio Cometa ou *Single-Cell Gel Electrophoresis* (SCGE) é utilizado para detectar lesões genômicas que são passíveis de correção, para estudos de reparo do DNA, trazendo informações importantes sobre a cinética e o tipo de lesão reparada (HARTMANN *et al.*, 2003; RIBEIRO *et al.*, 2003; RUNDELL *et al.*, 2003; WIKLUND e AGURELL, 2003). Porém o teste *in vitro* possui algumas limitações como exemplo, tempo de exposição e utilização de ativação metabólica (como S9 mix) (TICE *et al.*, 2000). Por outro lado, o Ensaio Cometa *in vivo* conta com a participação de enzimas de metabolização específicas do citocromo P450. Além disso, nos permite verificar, *in vivo*, a atividade genotóxica de substâncias sem a influência de fatores farmacocinéticos como a absorção, distribuição, metabolização e excreção. Desta forma muitos testes que apresentam resultado positivo *in vitro*, podem não expressar o mesmo resultado *in vivo*, provavelmente devido a estes fatores (SCHWAAB *et al.*, 2005).

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 desnovelamento das cadeias de DNA, pelo rompimento das estruturas secundárias e terciárias. 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; HARTMANN *et al.*, 2003; VILLELA *et al.*, 2003; WITTE *et al.*, 2007).

Para interpretação dos resultados, as células são analisadas desde a classe zero, onde o DNA apresenta-se intacto, até a classe 4 quando o DNA das células apresenta-se praticamente todo fragmentado parecendo um “Cometa”. O índice de danos no DNA das células é mensurado 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. 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 (SZETO *et al.*, 2002).

1.4.2. Teste de micronúcleo em medula óssea de camundongos

O teste MN é o ensaio *in vivo* mais utilizado para detecção de agentes clastogênicos, que causam quebras cromossômicas, e de agente aneugênicos que induzem erros na segregação cromossômica (MACGREGOR *et al.*, 1987; HAYASHI *et al.*, 1994). Micronúcleos são pequenos corpúsculos constituídos por material cromossômico perdidos pelo núcleo principal da célula durante o processo mitótico. Este material cromossômico presente no citoplasma celular é envolvido por uma membrana nuclear, sendo visualizado como um pequeníssimo núcleo separado do núcleo principal da célula, denominado micronúcleo (RIBEIRO *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 quebras cromossômicas (DA SILVA *et al.*, 2003).

Os eritrócitos são células abundantes na medula óssea e sangue periférico de mamíferos, utilizados no teste pela ausência de núcleo e possibilidade de diferenciar eritrócitos jovens devido a presença de RNA. Os eritrócitos jovens, denominados eritrócitos policromáticos (EPC) contêm RNA ribossômico e diferenciam-se pela coloração com corante para ácidos nucleicos, 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 (VILELLA *et al.*, 2003).

1.5. Teste para avaliação do potencial antioxidante

Antioxidante é definido como qualquer agente que em baixa concentração retarda ou inibe a oxidação de substâncias químicas resultantes de reações metabólicas ou por fatores exógenos como as radiações ionizantes formadoras de radicais livres (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2000; BROZMANOVÁ *et al.*, 2001).

Os antioxidantes incluem as vitaminas (A, E e C), minerais, pigmentos naturais, compostos polifenólicos e enzimas endógenas como superóxido dismutase (SOD), Catalase (CAT), glutaciona-peroxidase (GPx) e glutaciona redutase (GR), que bloqueiam o efeito danoso dos radicais livres (BORELLA e VARELA, 2004; HWANG e KIM, 2007; KARIHTALA e SOINI, 2007).

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 reativos incluem os radicais hidroxil HO^\bullet , ânion superóxido $\text{O}_2^{\bullet-}$, óxido nítrico NO^\bullet , alcóxila RO^\bullet , peróxila ROO^\bullet e peroxinitrito ONOO^- e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Estas espécies reativas de oxigênio podem alterar a estrutura de proteínas, danificarem processos enzimáticos e membranas lipídicas (peroxidação lipídica) e provocar danos ao DNA (HWANG e KIM, 2007).

Os compostos fenólicos são formados por anéis aromáticos com grupos hidroxilados, sendo portanto capazes de quelar metais e varrer radicais livres pela formação de radicais fenoxil. Dentre estes, os flavonóides, presentes nas plantas, possuem atividade antioxidante devido a sua capacidade sequestradora de radicais livres como o ânion superóxido, o radical hidroxil ou peróxil (RICE-EVANS, 1995; RICE-EVANS *et al.*, 1996, 1997; RICE-EVANS, 2001). Além disso, esta classe de metabólitos secundários

pode apresentar efeito antioxidante através da habilidade de estabilizar as membranas celulares (HARBORNE e WILLIAMS, 2000).

1.5.1. Teste hipoxantina/xantina oxidase e DPPH

O teste DPPH *in vitro* é um método amplamente utilizado e relativamente rápido (SÁNCHEZ-MORENO *et al.*, 1998; MENSOR *et al.*, 2001), usado para avaliar qualitativa e quantitativamente a atividade antioxidante de uma substância ou de um extrato frente ao radical DPPH. O teste DPPH baseia-se na capacidade do radical livre estável 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) em reagir com substâncias doadoras de H como os compostos fenólicos (ROGINSKY & LISSI, 2005).

Através do consumo de DPPH obtém-se um índice para estimar a capacidade antioxidante na captura de radicais livres presentes no meio. No ensaio espectrofotométrico, a absorvância a 517 nm diminui como um resultado de uma alteração na coloração violeta característica para amarelo, uma vez que o radical é capturado por antioxidantes presentes na amostra através da doação de um átomo de H para formar a molécula estável DPPH-H (ESPÍN *et al.*, 2000).

Além do método DPPH foi realizado o Teste hipoxantina/xantina oxidase que fundamenta-se no processo de hidroxilação da hipoxantina. Neste teste, a hipoxantina 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 concentração do radical hidroxila é determinada baseando-se 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 14), que podem ser medidos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (OWEN *et al.*, 1996; OWEN *et al.*, 2000). Porém, 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).

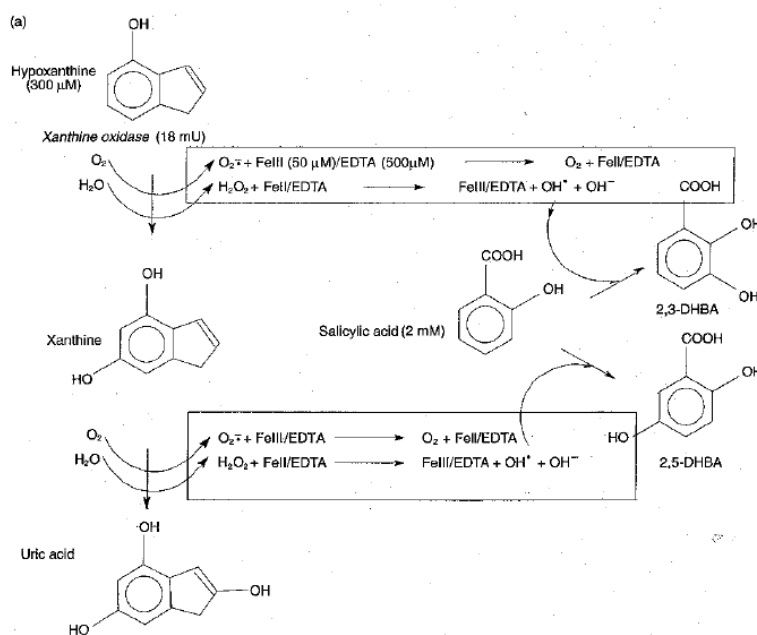


Figura 14. Esquema para geração de espécies reativas de oxigênio no sistema hipoxantina/xantina oxidase (OWEN *et al.*, 2000).

II OBJETIVOS

1. Objetivo geral

Avaliar a atividade mutagênica, genotóxica e/ou antigenotóxica do extrato bruto de partes aéreas de *Baccharis dracunculifolia* e *Baccharis trimera* através do teste de micronúcleos e teste cometa, *in vivo*.

1.2. Objetivos específicos

- Caracterizar a constituição fitoquímica das partes aéreas de *B. dracunculifolia* e *B. trimera*.
- Avaliar a atividade mutagênica dos extratos aquosos de *B. dracunculifolia* e *B. trimera*, através dos testes de micronúcleos *in vivo*.
- Verificar ação genotóxica e antigenotóxica dos extratos aquosos de *B. dracunculifolia* e *B. trimera*, através do teste cometa *in vivo*.
- Determinar o potencial antioxidante *in vitro* dos extratos aquosos de *B. dracunculifolia* e *B. trimera* através do teste xantina/hipoxantina oxidase e do ensaio de DPPH.

III - ARTIGOS

Artigo 1.

Mutagenic and genotoxic effects of *Baccharis dracunculifolia* DC

(A ser submetido à revista *Metagêneses*)

Artigo 2.

Genotoxic and antigenotoxic properties of *Baccharis trimera* in mice

(A ser submetido ao *Journal of Ethnopharmacology*)

Mutagenic and genotoxic effects of *Baccharis dracunculifolia* DC

Carmem R. F. Rodrigues, Jacqueline H. Dias, Juliane G. Semedo, Alexandre B. F. Ferraz, Jaqueline N. Picada*

Programa de Pós-Graduação em Genética e Toxicologia Aplicada, Universidade Luterana do Brasil (ULBRA), Canoas, RS, Brasil.

*Corresponding author. Laboratório de Genética Toxicológica, Avenida Farroupilha 8001, Bairro São José, CEP 92425-900, Canoas – RS, Brasil. Tel.: 51 34774000.

E-mail address: jnpicada@cpovo.net

Abstract

Baccharis dracunculifolia DC (Asteraceae), a native plant to Brazil known as “vassourinha” or “alecrim-do-campo”, is the most important botanical source of a Brazilian propolis called green propolis. The leaf extracts of this plant have been used to treat liver and digestive disorders. It has been recognized that green propolis can induce mutagenic effects at high doses, but no study reporting possible mutagenic effects by *B. dracunculifolia* extracts in the maximum tolerated dose has been conducted. The aim of the present study was to investigate the genotoxic and mutagenic effects of this plant *in vivo*. Adult CF-1 mice were treated with 500 mg/kg, 1000 mg/kg or 2000 mg/kg of an aqueous extract of *B. dracunculifolia* by gavage for 3 consecutive days. Blood and liver samples were collected to detect DNA damage using the comet assay, while bone marrow samples were used to assess chromosome mutations by the micronucleus test. The extract increased the DNA damage in blood and liver tissues and the frequency of micronucleus in bone marrow. These findings suggest genotoxic and mutagenic effects of *B. dracunculifolia* comparable to green propolis in mice.

Keywords: *Baccharis dracunculifolia*; Comet assay; Micronucleus test, green propolis.

1. Introduction

The *Baccharis* genus (*Asteraceae*) is represented by more than 500 species distributed mainly in the tropical areas of South America. Many of these species are extensively used in folk medicine in the treatment or prevention of liver diseases, rheumatism, diabetes, as well as digestive and hepatic disorders (Torres et al., 2000, Verdi et al., 2005, Borella et al., 2006, Fukuda et al., 2006). Phytochemical studies on species belonging to the genus *Baccharis* have demonstrated the presence of flavonoids (mainly flavone and flavonol subgroups), diterpenes (mainly labdane and clerodane diterpenes) and triterpenes (Verdi et al, 2005). *Baccharis dracunculifolia*, commonly known as “alecrim-do-campo” and “vassoura”, has been indicated as the most important botanical source of green propolis (Park et al., 2002; 2004; Kumazawa et al., 2003; Lemos et al., 2007). The leaf extracts from this plant have been used as an antipyretic, stomachic and health tonic in folk medicine (Fukuda *et al.*, 2006). Studies have reported *B. dracunculifolia* as well as green propolis to exert anticariogenic (Leitão et al., 2004) and trypanocidal activities (Silva Filho et al., 2004). A hydroalcoholic extract of *B. dracunculifolia* showed anti-ulcerogenic properties (Lemos et. al., 2007).

The majority of medicinal plants have not been studied as to their toxic or mutagenic potentials (Horn and Vargas, 2008; Costa *et al*, 2008). Some species from the *Baccharis* genus present marked toxicity (Jarvis et al, 1996; Monks et al, 2002, Varaschin and Alessi, 2003). Recently, genotoxic and mutagenic effects have been reported for green propolis in mice (Pereira et al., 2008); however, *B. dracunculifolia* extracts did not induce these effects at low doses (Resende et al., 2007). In order to contribute to the evaluation of health risks involved in the intake of infusions of *B. dracunculifolia* medicinal plant, this study

evaluated the genotoxic and mutagenic activities of an aqueous extract of this plant after high-dose treatments in mice.

2. Materials and methods

2.1. Plant material

Aerial parts of *B. dracunculifolia* were collected in March 2007, Canoas, RS, Brazil.

Voucher specimens were identified by Dr. Sergio Bordignon. An exsiccata n. 4040 has been deposited at the Herbarium at Lutheran University of Brazil (HERULBRA).

2.2. Preparation of extracts

The fresh aerial parts of the plant were air-dried at room temperature for seven days. The dried aerial parts were finely milled and the aqueous extracts were prepared by infusion (1/10 plant/solvent). The infusion stood at room temperature for 30 min. After cooling and filtered, the extracts were frozen and concentrated by lyophilization for five days overnight, to obtain the *B. dracunculifolia* aqueous extract (Bd-AE).

2.3. Phytochemical screening

The phytochemical analysis (flavonoids, tannins, anthraquinones, alkaloids, saponins, coumarins and cardiac glycosides) of aerial parts of *B. dracunculifolia* was carried out according to the methods described by Harborne (1998). The thin layer chromatography analyses were performed following systems and developers indicated by Wagner and Bladt (1996).

2.4. Animals and treatments

Female (CF-1) mice weighing 20–30 g from our breeding colony were used. Animals were housed in cages with food and water available *ad libitum*, under a 12-h light / dark cycle, and at a constant temperature of 23 ± 3 °C. All experimental procedures were carried out in

accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the National Institutes of Health (NIH).

The animals were divided to form groups with 9 or 10 individuals per group, and treated by gavage once a day with saline solution (NaCl 0.9%; 1 mL/kg) or Bd-AE (500 mg/kg, 1000 mg/kg or 2000 mg/kg) for three consecutive days. The maximum tolerated dose (MTD), 2000 mg/kg, was used as the highest dose level and the other doses used were 50 and 25 % of MTD. All the animals were sacrificed by decapitation on the fourth day, and blood and liver were sampled for the comet assay, and bone marrow was sampled from femurs for the micronucleus test. A positive control group (treated with cyclophosphamide 25 mg/kg, i.p for two days) was included for the micronucleus test.

2.5. Comet assay

The alkaline comet assay was carried out as described by Tice et al, (2000) with minor modifications (Picada et al, 2003). Each piece of liver was placed in 0.5 mL of cold phosphate-buffered saline (PBS) and finely minced in order to obtain a cell suspension. Liver and blood cell suspensions (5 μ L) were embedded in 95 μ L of 0.75% low melting point agarose (Gibco BRL) and spread on agarose-precoated microscope slides. After solidification, slides were placed in lysis buffer (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA and 10 mM Tris, pH 10.0), with freshly added 1% Triton X-100 (Sigma) and 10% DMSO for 48 h at 4 °C. The slides were subsequently incubated in freshly prepared alkaline buffer (300 mM NaOH and 1 mM EDTA, pH >13) for 20 min, at 4 °C. An electric current of 300 mA and 25 V (0.90 V/cm) was applied for 15 min to perform DNA electrophoresis. The slides were then neutralized (0.4M Tris, pH 7.5), stained with silver (Nadin et al, 2001) and analyzed using a microscope. Images of 100 randomly selected cells (50 cells from each of two replicate slides) were analyzed from each animal. Cells were also visually scored

according to tail size into five classes ranging from undamaged (0) to maximally damaged (4), resulting in a single DNA damage score to each animal, and consequently to each studied group. Therefore, the damage index (DI) can range from 0 (completely undamaged, 100 cells X 0) to 400 (with maximum damage, 100 cells X 4). Damage frequency (%) was calculated based on the number of tailed versus tailless cells (Picada et al., 2003).

2.6. Micronucleus test

The micronucleus test was performed according to the US Environmental Protection Agency Gene-Tox Program (Mavournin et al., 1990; Stopper et al., 1997). Bone marrow from both femurs was suspended in foetal calf serum and smears on clean glass slides were prepared as in a previous report (Picada et al 1997). Slides were air-dried, fixed in methanol, stained in 10% Giemsa and coded for a blind analysis. To avoid false negative results and as to obtain a measure of toxicity on bone marrow, the polychromatic erythrocytes: normochromatic erythrocytes (PCE:NCE) ratio was scored in 1000 cells. The incidence of micronuclei (MN) was observed in 2000 PCE for each animal.

2.7. Data analysis

Results are expressed as means \pm S.D and statistical significance was determined by One-Way Analysis of Variance (ANOVA). In all comparisons, $P < 0.05$ was considered as indicating statistical significance.

3. Results

Phytochemical analyses of *B. dracunculifolia* indicated the presence of saponins and flavonoids. Other secondary metabolites such as anthraquinones, cardiac glycosides, coumarins, alkaloids and tannins were not detected.

Table 1 shows the DNA damage induced by Bd-AE, as assessed by the comet assay. In the group receiving the highest dose (3 X 2000 mg/kg) an increase in the damage index both was observed in blood and liver tissues, in comparison to the saline group.

Table 2 shows the micronucleus test results. There was a significant increase in the frequency of micronucleus in PCE from the positive control group treated with cyclophosphamide, in agreement with the historical values of our laboratory. Clinical signs of toxicity were observed in some animals treated with 3 X 2000 mg/kg of Bd-AE; however, no animal died thereof. In this group, a significant decrease in the PCE/NCE ratio was observed, indicating some cytotoxicity to bone marrow. In all treatments with Bd-AE there was an increase in the frequency of micronuclei in PCE, in comparison to the saline group.

4. Discussion

Because of the wide range of biological effects and uses for *B. dracunculifolia* in the treatments of several disorders, this study evaluated the genotoxic and mutagenic activities of an aqueous extract of this plant in mice. The comet assay was used to detect recent DNA damage, such as single and double strand breaks, alkali-labile sites, DNA-DNA and DNA-protein crosslinks, while the micronucleus test was used to detect clastogenic/aneugenic activities, which leads to increasing frequency of micronucleus, and suggests mutagenic effects at chromosomal level (Hartmann et al., 2003; Stopper et al., 1997).

The phytochemical screening of *B. dracunculifolia* showed the presence of flavonoids and saponins, a finding in accordance with those of previous studies reporting flavonoids (Soicke and Peschlow 1987; Sharp et al., 2001, Silva et al., 2006, Verdi et al., 2005) and saponins (Gene et al., 1996, Borella et al., 2006; Mendes et al., 2007) in the *Baccharis*

genus. The chemical constituents of *B. dracunculifolia* leaf bud extracts have been found to be similar to those of green propolis (Park et al., 2002; 2004; Sousa et al., 2007).

At the highest dose used in this study, Bd-AE significantly increased DNA damage in blood and in liver tissues of the mice treated, suggesting the occurrence of genotoxic effects (Table 1). Some cells showed a large amount of DNA damage (mainly class 2 and 3) from mice treated with the highest dose. However, at lower doses class 1 was the most frequent among the Bd-AE-damaged cells, which is considered minimal damage. These results indicate that this extract can induce genotoxic effects in different tissue/organs in mice, depending on the dose used. Recently, similar *in vivo* results were reported, showing a significant increase in DNA damage in leukocytes sampled from mice treated with a single dose 1500 or 2000 mg/kg of green propolis (Pereira et al., 2008).

At lower doses, no significant reduction in the PCE/NCE ratio was observed as compared to the saline group, demonstrating the absence of cytotoxicity on bone marrow (Table 2). However, at the highest dose (3 X 2000 mg/kg), Bd-AE decreased PCE/NCE ratio, indicating cytotoxicity. According to previous studies, green propolis and *B.*

dracunculifolia extracts were shown to be cytotoxic in different cell lines (Fukuda et al., 2006; Funari et al., 2007). A methanolic extract of propolis showed strong cytotoxicity toward human HT-1080 fibrosarcome and murine colon 26-L5 carcinoma cells (Banskota et al., 1998). Propolis from *B. dracunculifolia* has been found to exert a concentration-dependent toxic effect on mouse NIH-3T3 fibroblasts (Funari et al., 2007). Monoterpene phenols and sesquiterpenes isolated from *B. dracunculifolia* showed strong cytotoxic effect against leukemia cells (L 1210) (Fukuda et al, 2006). The present study is the first to show *in vivo* cytotoxicity on bone marrow cells for *B. dracunculifolia*.

In addition, Bt-AE exerted mutagenic effects on bone marrow (Table 2). The extract increased the micronucleated PCE in about three times, in comparison to the saline group. In studies using Chinese hamster ovary cells (CHO), a propolis ethanol extract as well as an ethyl acetate extract of *B. dracunculifolia* increased frequency of chromosome aberrations, both at the highest concentration tested (100 μ g/ml) (Tavares et al., 2006; Munari et al., 2008). The extract of *B. dracunculifolia* was mutagenic at the highest concentration tested (100 μ g/ml), whereas at the lowest concentration it exerted chemopreventive effects against the chromosome damages induced by doxorubicin in CHO cells (Munari et al., 2008). Flavonoids have been suggested to be the components mainly responsible for both the mutagenic and antimutagenic effects of propolis and *B. dracunculifolia* extracts (Tavares et al., 2006; Munari et al., 2008).

In agreement with our findings, a green propolis aqueous extract induced genotoxic and mutagenic activities in mice treated with similar doses used here (Pereira et al., 2008). However, in a study conducted to evaluate mutagenic/antimutagenic activities *in vivo*, the extract of *B. dracunculifolia* did not increase micronucleus frequency when tested at a low dose (24 mg/kg) in rats (Resende et al., 2007), suggesting that the mutagenic effects in rodents appear to be observed only at high doses of these extracts. It is also important to point out that the main plant source for green propolis is *B. dracunculifolia*. For this reason, *B. dracunculifolia* and green propolis extracts present similar chemical constituents, leading to comparable biological activities (Banskota et al., 1998; Kumazawa, 2003; Fukuda et al., 2006; Funari et al., 2007).

More than three hundred organic compounds of different groups, mainly phenolic, such as flavonoids, stilbenes, phenolic acid and its esters have been identified in propolis (Bankova et al., 1992; Simões et al., 2004). Phenolic compounds including flavonoids are its major

constituents (Banskota et al., 1998). In fact, some flavonoids produce a genotoxic effect at high concentrations (Ferguson, 2001, da Silva et al.2002, Pereira et al., 2006), as quercetin, rutin (da Silva et al., 2002). Caffeic acid, a phenolic acid found in *B. dracunculifolia* extracts (Resende et al., 2007; Munari et al., 2008), induced DNA damage in rats at 8 mg/kg (Pereira et al., 2006). The molecular mechanisms of the mutagenicity caused by flavonoids are unknown; however, results from different studies demonstrated that they can act as pro-oxidants, depleting the nuclear antioxidant defense systems and leading to oxidative DNA damage, which may be responsible for their mutagenicity (Sahu et al.1996; Silva et al., 1996; da Silva et al., 2002).

In conclusion, Bd-AE showed genotoxic and mutagenic effects comparable to green propolis. Although these effects were evaluated at very high doses, other mutagenicity tests are necessary to establish the safe use of *B. dracunculifolia* extracts for humans.

5. Acknowledgements

This work was supported by ULBRA (Universidade Luterana do Brasil); CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico); and FAPERGS (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul) Casadinhos [grant number 0619795], Brazil. Semedo JG is recipient of PIBIC/CNPq fellowship.

6. References

- Banskota,A.H., Tezuka,Y., Prasain,J.K., Matsishige,K., Saiki,I., Kadota,S. (1998) Chemical constituents of Brazilian propolis and their cytotoxic activities. *J. Nat. Prod.*, 61, 896-900.
- Bankova,V., Christov,R., Stoev,G., Popov,S. (1992) Determination of phenolics from propolis by capillary gas chromatography. *J. Chromatogr. B, Biomed. Appl.*, 607, 150-153.
- Borella,J.C., Donata,P.D., Novaretti,A.G., Menezes Jr,A., França,S.C., Rufato, Pierre,C.B., Santos,A.S., Veneziani,R.C.S., Lopes,N.P. (2006) Variabilidade sazonal do teor de saponinas de *Baccharis trimera* (Less.) DC. (Carqueja) e isolamento de flavona. *Braz. J. Pharmacognosy* 16, 557-561.
- Costa,R.J., Diniz,A., Mantovani,M.S., Jordão,B.Q. (2008) *In vitro* study of mutagenic potential of *Bidens pilosa* Linné and *Mikania glomerata* Sprengel using the comet and micronucleus assays. *J. Ethnopharmacol* 118, 86-93.
- Da Silva,J., Herrmann,S.M., Heuser,V., Peres,W., Marroni, P.N., Gonzalez-Gallego, J., Erdtmann,B. (2002) Evaluation of the genotoxic effect of rutin and quercetin by comet assay and micronucleus test. *Food Chem. Toxicol.*, 40, 941-7.
- Ferguson,L.R. (2001) Role of plant polyphenols in genomic stability. *Mutat. Res.*, 475, 89-111.
- Fukuda,M., Ohkoshi,E., Makino,M., Fujimoto,Y. (2006) Studies on the Constituents of the Leaves of *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae) and their Cytotoxic Activity. *Chem. Pharm. Bull.* 54, 1465 -1468.
- Funari,C.S., Ferro V.O., Mathor M.B. (2007) Analysis of propolis from *Baccharis dracunculifolia* DC. (Compositae) and its effects on mouse fibroblasts. *J. Ethnopharmacol.* 111, 206–212.

- Gene,R.M.C., Cartana,T., Adzet,E, Marin,T., Parella,S.C. (1996). Anti-inflammatory and analgesic activity of *Baccharis trimera*: Identification of its active constituents. *Planta Med.* 62, 232–235.
- Hartmann,A., Agurell,E., Beevers,C., Brendler-Schwaab,S., Burlinson,B., Clay,P., Collins,A., Smith,A., Speit,G., Thybaud,V., Tice,R.R. (2003) Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. *Mutagenesis*, 18, 45-51.
- Harborne,J. B. (1998) *Phytochemical Methods*. Clarendon Press, Oxford, p.295.
- Horn, R.C., Vargas, V.M.F. (2008) Mutagenicity and antimutagenicity of teas used in popular medicine in the *salmonella*/microsome assay. *Toxicol. In Vitro* 22, 1043-1049.
- Jarvis,B.B., Wang,S., Cox.C., Rao,M.M., Philip,V., Varaschin,M.S., Barros,C.S. (1996) Brazilian *Baccharis* toxins: livestock poisoning and the isolation of macrocyclic trichothecene glucosides. *Nat. Toxins*, 4, 58–71.
- Kumazawa,S., Yoneda,M., Shibata,I., Kanaeda,J., Hamasaka,T., Nakayama,T. (2003) Direct evidence for the plant origin of Brazilian propolis by the observation of honeybee behavior and phytochemical analysis. *Chem. Pharm. Bull.*, Tokyo 51, 740-742.
- Leitão,D.P.S., Filho,A.A.S., Polizello,A.C.M., Bastos,J.K, Spadaro,A.C.C. (2004) Comparative evaluation of in-vitro effects of Brazilian green propolis and *Baccharis dracunculifolia* extracts on cariogenic factors of *Streptococcus mutan*. *Biol. Pharm. Bull.*, 27, 1834-1839.
- Lemos,M.B., Sousa,M.P., Barreto,J.P., Silva Filho,A.A., Kenupp,J.B., Andrade,S.F. (2007) *Baccharis dracunculifolia*, the main botanical source of Brazilian green propolis, displays antiulcer activity. *J. Pharm. Pharm.*, 59, 603-608.

- Mavournin,K.H., Blakey,D.H., Cimino,M.C., Salamone,M.F., Heddle,J.A. (1990) The *in vivo* micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the US Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutat. Res.*, 239, 29–80.
- Mendes, F.R., Tabach,R., Carlini,E.A. (2007) Evaluation of *Baccharis trimera* and *Davilla rugosa* in tests for adaptogen activity. *Phytother. Res.*, 21, 517-22.
- Monks,N.R., Bordignon,S.A.L., Ferraz,A., Machado,K.R., Faria,D.H., Lopes,R.M., Mondin,C.A., Souza,I.C.C., Lima,M.F.S., Rocha,A.B., Schwartzmann,G. (2002) Anti-tumour Screening of Brazilian Plants. *Pharm. Biol.* 40, 494 - 500.
- Munari,C.C., Resende,FA, Alves,J.M., Sousa,J.P.B., Bastos,J.K., Tavares,D.C. (2008) Mutagenicity and antimutagenicity of *Baccharis dracunculifolia* extract in chromosomal aberation assays in chinese hamster ovary cells. *Planta Med.*, 74, 1363-1367.
- Nadin,S.B., Vargas-Roig,L.M., Ciocca,D.R. (2001) A silver staining method for single-cell gel assay. *J. Histochem. Cytochem.*, 49, 1183– 1186.
- Park,Y.K., Alencar,S.M., Aguiar,C.L. (2002) Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 2502–2506.
- Park,Y.K., Paredes-Guzman,J.F., Aguiar,C.L., Alencar,S.M., Fujiwara,F.Y. (2004) Chemical constituents in *Baccharis dracunculifolia* as the main botanical origin of Southeasters Brazilian propolis. *J. Agric. Food Chem.*, 52, 1100-1103.
- Pereira,A.D., Andrade,S.F., Swerts,M.S.O., Maistro,E. L. (2008) First *in vivo* evaluation of the mutagenic effect of Brazilian green propolis by comet assay and micronucleus test. *Food Chem. Toxicol.*, 46, 2580–2584.

- Pereira,P., Oliveira,P., Ardenghi,P., Rotta,L.N., Henriques,J.A.P., Picada,J.N. (2006)
Neuropharmacological analysis of caffeic acid in rats. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.*, 99,
374 - 378.
- Picada,J.N., Da Silva,K.V., Erdtmann,B., Henriques,A.T., Henriques,J.A.P. (1997) Genotoxic
effects of structurally related beta-carboline alkaloids. *Mutat. Res.*, 379, 135–149.
- Picada,J.N., Flores,D.G., Zettler,C.G., Marroni,N.P., Roesler,R., Henriques,J.A.P. (2003) DNA
damage in brain cells of mice treated with an oxidized form of apomorphine. *Mol. Brain
Res.*, 114, 80–85.
- Resende,F.A., Alves,J.M., Munari,C.C., Senedese,J.M., Sousa,J.P., Bastos,J.K., Tavares,D.C.
(2007) Inhibition of oxorubicin-induced mutagenicity by *Baccharis dracunculifolia*. *Mutat.
Res.*, 634, 112–118.
- Sahu,S.C., Gray,G.C. (1996) Pro-oxidant activity of flavonoids: effects on glutathione and
glutathione S-transferase in isolated rat liver nuclei. *Cancer Lett.*, 104, 193-196.
- Silva,I.D., Rodrigues,A., Gaspar,J., Maia,R., Laires,A., Rueff,J. (1996) Mutagenicity of
kaempferol in V79 cells: the role of cytochromes P450. *Teratog. Carcinog. Mutagen.*, 16,
229-41.
- Silva,F.G., Januário,A.H., Pinto,J.E.B.P., Nascimento,V.E., Barizan,W.S., Sales,J.F., Franca,S.C.
(2006) Flavonoids content in native and cultivated populations of "carqueja" [*Baccharis
trimera* (Less.) DC.] harvested at dry and humid season. *Revista Brasileira de Plantas
Medicinais* 8, 19-25.
- Silva Filho,A.A.S., Bueno,P.C.P., Gregório,L.E., Silva,M.L.A., Albuquerque,S., Bastos,J.K.
(2004) In vitro trypanocidal activity evaluation of crude extract and isolated compounds
from *Baccharis dracunculifolia* DC. *J. Pharm. Pharmacol.*, 56, 1195-1199.

- Simões,L.M.C., Gregório,L.E., da Silva Filho,A.A., de Sousa,M.L., Azzolini,A.E.C.S., Bastos,J.K., Lucisano-Valim,Y.M. (2004) Effect of Brazilian green propolis on the production of reactive oxygen species by stimulated neutrophils. *J. Ethnopharmacol.*, 94, 59-65.
- Soicke,H., Peschlow,E.L. (1987) Characterisation of flavonoids from *Baccharis trimera* and antihepatotoxic properties. *Planta Med.*, 53, 37-9.
- Sousa,J.P., Bueno,P.C., Gregório,L.E., Silva Filho,A.A.S., Furtado,N.A., Sousa,M.L, Bastos, J.K. (2007) A reliable quantitative method for the analysis of phenolic compounds in Brazilian propolis by reverse phase high performance liquid chromatography. *J. Sep. Sci.*, 30, 2656-2665.
- Stopper,H., Eckert,I., Wagener,P., Schulz,W.A. (1997) Formation of micronuclei and inhibition of topoisomerase II in the comet assay in mammalian cells with altered DNA methylation. *Recent Results Cancer Res.*, 143, 183–193.
- Tavares,D.C., Barcelos,G.R.M., Silva,L.F., Tonin,C.C.C., Bastos,J.K. (2006) Propolis-induced genotoxicity and antigenotoxicity in Chinese hamster ovary cells. *Toxicol. In Vitro*, 20, 1154–1158.
- Tice,R.R., Agurell,E., Anderson,D., Burlinson,B., Hartmann,A., Kobayashi,Y., Miyamae,Y., Rojas,E., Ryu,J.C., Sasaki,Y.F. (2000) Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. *Environ. Mol. Mutagen.*, 35, 206–221.
- Torres,L.M.B., Gamberini,M.T., Roque,N.F., Lima-Landman,M.T., Souccar,C., Lapa,A. J. (2000) Diterpene from *Baccharis trimera* with a relaxant effect on rat vascular smooth muscle. *Phytochemistry*, 55, 617-619.

Varaschin,M.S., Alessi,A.C. (2003) Poisoning of mice by *Baccharis coridifolia*: an experimental model. *Vet. Hum. Toxicol.*, 45, 42–44.

Verdi,L.G., Brighente,I.M.C., Pizzolatti,M.G. (2005) Gênero *Baccharis* (ASTERACEAE): Aspectos Químicos, Econômicos e Biológicos. *Quimica Nova* 28, 85-94.

Wagner,H., Bladt,S. (1996) *Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas*. Springer-verlag, Berlin, p. 369.

Table 1. Genotoxic activity in blood and liver of mice treated with saline or Bd-AE (500, 1000 or 2000 mg/kg) three consecutive days and sacrificed 24 h after the last administration.

Group	Blood		Liver	
	DI	DF (%)	DI	DF (%)
Saline	47.6 ± 25.0	44.0 ± 24.9	73.0 ± 63.8	74.7 ± 25.3
Positive control	171.5 ± 50.3**	53.3 ± 11.7	321.5 ± 33.2**	93.7 ± 4.7
Bd-AE 3 X 500 mg/kg	57.2 ± 39.1	47.1 ± 19.6	50.4 ± 23.2	47.1 ± 28.4
Bd-AE 3 X 1000 mg/kg	68.9 ± 36.4	42.3 ± 29.0	75.4 ± 48.1	72.4 ± 13.3
Bd-AE 3 X 2000 mg/kg	98.0 ± 42.6**	74.3 ± 24.6	107.9 ± 67.7**	71.4 ± 22.7

DI: damage index: can range from 0 (completely undamaged. 100 cells x 0) to 400 (with maximum damage 100 cells x 4); DF (%): damage frequency: was calculated based on number of cells with tail versus those with no tail.

Positive control: blood or liver cells from the saline group treated *ex vivo* with hydrogen peroxide 0.20 mM.

**P < 0.01; statistically significant difference from the saline group (ANOVA. Tukey' test).

Table 2. Mutagenic activity in bone marrow of mice treated with saline or Bd-AE (500, 1000 or 2000 mg/kg) three consecutive days and sacrificed 24 h after the last administration.

Group	MNPCE in 2000 PCE	Ratio PCE:NCE
	Mean \pm SD	Mean \pm SD
Saline	3.70 \pm 1.15	1.42 \pm 0.40
Positive control	51.60 \pm 17.26***	1.11 \pm 0.19
Bd-AE 3 X 500 mg/kg	9.70 \pm 1.56**	1.37 \pm 0.48
Bd-AE 3 X 1000 mg/kg	10.50 \pm 2.17**	1.41 \pm 0.25
Bd-AE 3 X 2000 mg/kg	11.33 \pm 1.11**	0.93 \pm 0.47**

Positive control: cyclophosphamide (2 X 25 mg/kg).

P < 0.01, *P < 0.001, statistically significant difference from saline group (ANOVA. Tukey' test).

Genotoxic and antigenotoxic properties of *Baccharis trimera* in mice

Carmem R. F. Rodrigues, Jacqueline H. Dias, Rodrigo N. de Mello, Marc F. Richter, Jaqueline N. Picada, Alexandre B. F. Ferraz*.

Programa de Pós-Graduação em Genética e Toxicologia Aplicada, Universidade Luterana do Brasil (ULBRA), Canoas, RS, Brasil.

*Corresponding author. Laboratório de Fitoquímica, Avenida Farroupilha 8001, Bairro São José, CEP 92425-900, Canoas – RS, Brasil. Tel.: 51 34774000.

E-mail address: alexandre.ferraz@ulbra.br

Abstract

Baccharis trimera (Less) (Asteraceae) is a native plant to Brazil known as “carqueja”, popularly used to treat liver diseases, diabetes, as well as digestive disorders, particularly by women of lower socioeconomic status. The aim of the present study was to investigate the genotoxic/antigenotoxic and mutagenic potential of this plant *in vivo*, using the comet and the micronucleus assays. Female adult mice were treated with 500 mg/kg, 1000 mg/kg or 2000 mg/kg of *Baccharis trimera* aqueous extract (Bt-AE) by gavage for 3 consecutive days. No genotoxic effect was observed at any of the doses, in samples of blood and liver analyzed by the comet assay. Conversely, *B. trimera* showed antigenotoxic effect in blood from treated mice, protecting cells against oxidative DNA damage induced by the treatment *ex vivo* with hydrogen peroxide. In addition, Bt-AE showed antioxidant activity *in vitro*, assessed by DPPH and Hipoxanthine/xanthine oxidase assays, suggesting that the observed antigenotoxic effects might be related to its antioxidant properties. However, the extract increased the frequency of micronucleus in bone marrow of the treated mice, indicating chromosomal mutagenic activity. Thus, medicines prepared from this plant should be used with caution, although the findings also suggest antigenotoxic effects for *B. trimera*.

Keywords: *Baccharis trimera*; Comet assay; Micronucleus assay, xanthine oxidase, DPPH.

Introduction

The *Baccharis* genus (*Asteraceae*) is represented by more than 500 species distributed mainly in the tropical areas of South America. Many of these species are extensively used in folk medicine in the treatment or prevention of liver diseases, rheumatism, diabetes, as well as digestive and hepatic disorders (Torres *et al.*, 2000, Verdi *et al.*, 2005, Borella *et al.*, 2006, Fukuda *et al.*, 2006). Phytochemical studies on species belonging to the genus *Baccharis* have demonstrated the presence of flavonoids (mainly flavone and flavonol subgroups), diterpenes (mainly labdane and clerodane diterpenes) and triterpenes (Verdi *et al.*, 2005).

Baccharis trimera (Less.) (*Asteraceae*) is a widespread South American plant known as “carqueja”. Medicinal decoctions, infusions prepared with this plant are used in folk medicine to treat liver diseases, rheumatism, diabetes, as well as digestive, hepatic and renal disorders (Januario *et al.*, 2004), particularly by women of lower socioeconomic status (Grance *et al.*, 2008). Although several investigations on *Baccharis trimera* have demonstrated its efficacy, few are the studies available on its toxic effects. Recently, histopathological alterations were found in liver from pregnant rats treated with a hydroethanolic extract of *B trimera* (Grance *et al.*, 2008).

Considering the lack of *in vivo* studies on the toxic effects of this plant, the aim of the present study was to evaluate the genotoxic/antigenotoxic and mutagenic activities of an aqueous extract of *B. trimera*, using the comet assay in blood and liver and the micronucleus assay in the bone marrow of female mice. In addition, antioxidant properties of the extract were evaluated by DPPH and Hipoxanthine/xanthine oxidase *in vitro* assays.

2. Materials and methods

2.1. Plant material

Aerial parts of *B. trimera* were collected in March 2007, Canoas, RS, Brazil. Voucher specimens were identified by Dr. Sérgio Bordignon. An exsiccata n. 4041 has been deposited at the Herbarium at Lutheran University of Brazil (HERULBRA).

2.2. Preparation of extracts

The fresh aerial parts of the plant were air-dried at room temperature for seven days. The dried aerial parts were finely milled and the aqueous extracts were prepared by infusion (1/10 plant/solvent). The infusion stood at room temperature for 30 min. After cooling and filtered, the extracts were frozen and concentrated by lyophilization for five days overnight, to obtain the *B. trimera* aqueous extract (Bt-AE).

2.3. Materials / Chemicals and Reagents

2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), hypoxanthine, xanthine oxidase, ascorbic acid, rutin and salicylic acid were purchased from Sigma (St. Louis, USA).

2.4. Animals and treatments

A total of 25 female (CF-1) mice weighing 20–30 g from our breeding colony were used. Animals were housed in cages with food and water available *ad libitum*, under a 12-h light / dark cycle, and at a constant temperature of 23 ± 3 °C. All experimental procedures were carried out in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the National Institutes of Health (NIH).

The animals were divided to form groups with 5 individuals per group, and treated by gavage once a day with saline solution (NaCl 0.9%; 1 mL/kg) or Bt-AE (500 mg/kg, 1000 mg/kg or 2000 mg/kg) for three consecutive days. For the comet assay, peripheral blood samples were collected from each animal 3 h and 24 h after the first administration. All the animals were sacrificed by decapitation on the fourth day, and bone marrow from femurs was sampled for the micronucleus assay and blood and liver for comet assay. A positive

control group (treated with cyclophosphamide 25 mg/kg, i.p for two days) was included for the micronucleus assay.

2.5. Phytochemical screening

The phytochemical analysis (flavonoids, tannins, anthraquinones, alkaloids, saponins, coumarins and cardiac glycosides) of aerial parts of *B. trimera* was carried out according to the methods described by Harborne (1998). The thin layer chromatography analyses were performed following systems and developers indicated by Wagner and Bladt (1996).

2.6. Comet assay

The alkaline comet assay was carried out as described by Tice *et al*, (2000) with minor modifications (Picada *et al*, 2003). Each piece of liver was placed in 0.5 mL of cold phosphate-buffered saline (PBS) and finely minced in order to obtain a cellular suspension. Liver and blood cell suspensions (5 μ L) were embedded in 95 μ L of 0.75% low melting point agarose (Gibco BRL) and spread on agarose-precoated microscope slides. After solidification, slides were transferred to either PBS or 0.20 mM freshly prepared H₂O₂ solution (*ex vivo* treatment) for 5 min, at 4 °C (Pereira *et al*. 2005). Slides were washed 3 times with PBS and were placed in lysis buffer (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA and 10 mM Tris, pH 10.0), with freshly added 1% Triton X-100 (Sigma) and 10% DMSO for 48 h at 4 °C. The slides were subsequently incubated in freshly prepared alkaline buffer (300 mM NaOH and 1 mM EDTA, pH >13) for 20 min, at 4 °C. An electric current of 300 mA and 25 V (0.90 V/cm) was applied for 15 min to perform DNA electrophoresis. The slides were then neutralized (0.4 M Tris, pH 7.5), stained with silver (Nadin *et al*, 2001) and analyzed using a microscope. Images of 100 randomly selected cells (50 cells from each of two replicate slides) were analyzed from each animal. Cells were also visually scored according to tail size into five classes ranging from undamaged (0) to maximally damaged

(4), resulting in a single DNA damage score to each animal, and consequently to each studied group. Therefore, the damage index can range from 0 (completely undamaged, 100 cells X 0) to 400 (with maximum damage, 100 X 4) (Picada *et al.*, 2003).

2.7. Micronucleus assay

The micronucleus assay was performed according to the US Environmental Protection Agency Gene-Tox Program (Mavournin *et al.*, 1990; Stopper *et al.*, 1997). Bone marrow from both femurs was suspended in foetal calf serum and smears on clean glass slides were prepared as in a previous report (Picada *et al.* 1997). Slides were air-dried, fixed in methanol, stained in 10% Giemsa and coded for a blind analysis. To avoid false negative results and to obtain a measure of toxicity on bone marrow, the polychromatic erythrocytes: normochromatic erythrocytes (PCE/NCE) ratio was scored in 1000 cells. The incidence of micronuclei (MN) was observed in 2000 PCE for each animal.

2.8. Hypoxanthine/xanthine oxidase assay

The method employed to assay the hydroxyl radical scavenging ability of Bt-AE was based on the method of Owen *et al.*, (1996). Briefly, Bt-AE was dissolved in the assay buffer (hypoxanthine, Fe(III), EDTA and salicylic acid) at a concentration of 2.0 mg/mL and diluted appropriately (in triplicate) in assay buffer to a final volume of 1.0 mL, giving a range of 0.1-2.0 mg/mL. A 5- μ L aliquot of xanthine oxidase dissolved in 3.2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ was added to initiate the reaction. The sample tubes were incubated for 3 h at 37 °C, at which time the reaction was complete. A 30- μ L aliquot of the reaction mixture was analyzed by HPLC under chromatographic conditions as described by Owen *et al.*, (2000; 2003). Chromatographic analysis was done using a gradient based on methanol/water/acetic acid with a μ BondaPak C18 reverse phase column (Waters) and detection at 325 nm. The HPLC equipment had a 2695 separation module (Waters) and

UV detector 2487 (Waters). The hydroxylation of salicylic acid and hypoxanthine were monitored at $A = 325$ and $A = 278$ nm, respectively. The amount of dihydroxyphenols (2,5-dihydroxybenzoic acid and 2,3-dihydroxybenzoic acid) (2,5-DHBA and 2,3-DHBA) produced by hydroxyl radical ($\text{OH}\cdot$) attack on salicylic acid was determined from standard curves prepared with the respective pure dihydroxyphenols.

2.9. DPPH–scavenging assay

Scavenging of the DPPH free radical was measured, using a modified Yamaguchi *et al*, (1998) method in which the Bt-AE was added to Tris-HCl (100 mM) buffer, pH 7.0, containing 250 mM DPPH dissolved in methanol. At least six different dilutions of Bt-AE were tested, and allowed to stand for 20 min in the dark, before absorbance was measured at 517 nm using a Shimadzu spectrophotometer model UV-1602PC (Kyoto, Japan). The experiment was conducted in triplicate. Antioxidant activity (AOA) was expressed as IC_{50} (inhibitory concentration in $\mu\text{g}/\text{mL}$ of samples or positive controls necessary to reduce the absorbance of DPPH by 50%, as compared to the negative control). The lower the IC_{50} , the higher the AOA. Results were also expressed as AEAC (Ascorbic acid equivalent antioxidant capacity) in grams and calculated as follows:

$$\text{AEAC } (\mu\text{g AA/g}) = \text{IC}_{50(\text{AA})} / \text{IC}_{50(\text{sample})} \times 1$$

2.10. Data analysis

Results are expressed as means \pm S.D and statistical significance was determined by One-Way Analysis of Variance (ANOVA). In all comparisons, $P < 0.05$ was considered as indicating statistical significance.

3. Results

3.1. Phytochemical analyses

Phytochemical analyses of *B. trimera* indicated the presence of saponins and flavonoids. Other secondary metabolites such as anthraquinones, cardiac glycosides, coumarins, alkaloids and tannins were not detected.

3.2. Comet assay

Bt-AE increased the DNA damage index in blood sampled 3 h after the treatment of the mice with a single dose, in a dose-dependent way (Table 1). However, after 24 h there was no significant increase in damage index in comparison to the saline control. In addition, Bt-AE did not show any tendency to increase DNA damage after treatment *ex vivo* of the blood cells with H₂O₂ at any of the three doses, independently of the sampling time (data not shown).

The genotoxic/antigenotoxic effects after three consecutive doses of Bt-AE are shown in Table 2. In blood and liver tissues, no increase was observed in damage index in any of the treated groups, in relation to the saline group. Conversely, when the blood cells from mice treated with 3 X 500 and 3 X 1000 mg/kg of Bt-AE were challenged *ex vivo* with H₂O₂, there was a significant decrease in DNA damage in comparison to *ex vivo* treated blood cells from the saline group. However, the Bt-AE was not able to decrease DNA damage in liver cells treated *ex vivo* with H₂O₂ (Table 2).

3.3. Micronucleus assay

Table 3 shows the micronucleus assay results obtained for female mice treated with Bt-AE. The PCE/NCE ratios were not statistically different from those of the saline group. However, there was an increase in frequency of micronucleus in PCE from treated groups, when compared to saline group. The increase was not statistically significant only at 3 X 500 mg/kg of Bt-AE. It can be observed that at the highest dose of Bt-AE, the number of micronucleated polychromatic erythrocytes increased to about twice that of the saline

group (Table 3). Cyclophosphamide, a mutagen used as positive control, induced a significant increase in the frequency of micronucleus in PCE.

3.4. Hipoxantine/xanthine oxidase *in vitro* assay

Bt-AE displayed a pronounced *in vitro* antioxidant capacity in a dose-dependent manner (Figure 1). The extract was able to inhibit the DHBA formation in more than 70%. The IC_{50} value was calculated, and found to be 0.69 mg/mL.

The *in vitro* antioxidant activity of both extracts was determined by monitoring the production of hydroxyl benzoic acids (DHBA) as a product of the hydroxyl radical attack on salicylic acid in the hipoxanthine-xanthine oxidase assay. The reduction of total oxidation products as a function of the concentration of Bt-AE added to the assay is shown in Figure 1. The extract displayed a pronounced *in vitro* antioxidant capacity in a dose-dependent manner. The aqueous extract of *B. trimera* ($IC_{50} = 0.69$ mg/mL) reduced the formation of both DHBA species to 23.4 % in the highest concentration used (2 mg/mL).

3.5. DPPH assay

Bt-AE was shown to exert antioxidant activity in a concentration-dependent way, in the DPPH assay (Table 4). The free radical scavenging activity of the Bt-AE was higher than 90% at 1000 μ g/mL. The IC_{50} value for this extract was 92.39 μ g/mL. For the positive controls the IC_{50} found were 4.03 μ g/mL (ascorbic acid) and 18.93 μ g/mL (rutin).

The free radical scavenging effect of Bt-AE, as well as the positive controls ascorbic acid and rutin, were tested using the DPPH free radical scavenging assay. The result of the free radical scavenging effect of Bt-AE showed a concentration-dependent activity (Table 4). The free radical scavenging activity of Bt-AE was 90.7%, at a concentration of 1000 μ g/mL, while it was 53.3% at a concentration of 100 μ g/mL. The respective IC_{50} value for Bt-AE was 92.39 μ g/mL. In comparison, the results of the free radical scavenging effect of ascorbic acid ($IC_{50} = 4.03$ μ g/mL) and rutin ($IC_{50} = 18.93$ μ g/mL), used as positive

controls, were 99.6% and 96.7%, respectively, at a concentration of 1000 µg/mL, and 99.4% and 88.2% at a concentration of 100 µg/mL, in that order.

4. Discussion

The majority of the medicinal plants have not been studied in terms of their toxic or mutagenic potential (Horn and Vargas, 2008; Costa *et al.*, 2008). In order to contribute to the evaluation of the health risks posed by the intake of infusions of *B. trimera* medicinal plant, in this study we evaluated the genotoxic/antigenotoxic and mutagenic activities of the aqueous extract this plant *in vivo*.

The phytochemical screening of *B. trimera* showed the presence of flavonoids and saponins, in accordance with the results of previous studies reporting flavonoids (Soicke and Peschlow, 1987; Sharp *et al.*, 2001, Silva *et al.*, 2006, Verdi *et al.*, 2005) and saponins (Gene *et al.*, 1996, Borella *et al.*, 2006; Mendes *et al.*, 2007) in this genus.

In the comet assay, which detects a broad spectrum of DNA lesions, including double and single strand breaks, in the alkaline version used here (see Brendler-Schwaab *et al.*, 2005), Bt-AE showed a significant increase in DNA damage in blood sampled 3 h (Table 1). However, 24 h after Bt-AE withdrawal, DNA damages went down to the same levels as in the saline group, suggesting that induced DNA damage by Bt-AE is reversible or repaired (Table 1).

Similarly, in the treatment for three consecutive days, Bt-AE did not induce genotoxic effects in blood sampled 24 h after of the last administration (Table 2), reinforcing the possible DNA repair. Furthermore, 24 h after Bt-AE withdrawal, no genotoxic effect in liver was observed (Table 2). These findings are in agreement with a previous study showing that alterations observed in kidney and liver cells of female rats treated with *B.*

trimera are reversible, allowing tissue recovery as soon as administration of the extract is discontinued (Grance *et al.*, 2008).

The *ex vivo* comet assay was used to evaluate the potential antigenotoxicity of the extract, using hydrogen peroxide (H₂O₂) as inducer of oxidative DNA damage. Given that H₂O₂ is relatively stable, it diffuses through the plasma membrane towards the nucleus, where it reacts with DNA-bound transition metals to form hydroxyl radical via the Fenton reaction. Thus, H₂O₂ acts as a precursor of the hydroxyl radical, which then ultimately attacks cellular DNA, generating genotoxic effects (Brozmanová *et al.*, 2001).

Bt-AE did not protect blood cells against oxidative DNA damage induced by H₂O₂, 3 h and 24 h after a single administration (data not shown). However, an antigenotoxic effect was observed in blood cells from mice treated with 3 X 500 and 3 X 1000 mg/kg, by decreasing DNA damage induced *ex vivo* by H₂O₂ (Table 2). Since this effect was possible only after three repetitive trials, the protective effect could be attributed primarily to the cellular adaptive responses. This can be explained by the fact that Bt-AE-flavonoids induce the genic expression of antioxidant enzymes, apart from their capacity to scavenge free radicals.

In fact, Bt-AE showed significant *in vitro* antioxidant properties, reducing dose-dependently the DHBA formation in xanthine oxidase (Figure 1) and scavenging the free radical produced in the DPPH assay (Table 4). In comparison, using the DPPH-based assay, Bt-AE had a 22.9-fold lower antioxidant potential in relation to ascorbic acid, and a 4.9-fold lower antioxidant activity than that of rutin. Compared to the aqueous extracts of Brazilian green tea (*Camellia sinensis* var. *Assamica* IAC-259 Cultivar), harvested in summer and spring with IC₅₀-values of 13.64 to 15.83 µg/ml (Saito *et al.*, 2007), Bt-AE showed a five-fold lower activity. The differences of the Bt-AE IC₅₀ values for both

antioxidant assays might be explained due to different antioxidant compounds responsible for radical-scavenging in both tests.

The antioxidant properties detected are in accordance with literature data that shows antioxidant properties for *B. trimera* extracts (Oliveira *et al.*, 2004) and other *Baccharis* species such as *B. articulata* (Oliveira *et al.*, 2003), *B. illinita*, *B. platypoda* (Brighente *et al.*, 2007), and *B. grisebachii* (Tapia *et al.*, 2004).

The flavonoids are known for the ability to give a hydrogen atom to free radicals, thus neutralizing cations capable to produce the hydroxyl radical (Merken and Beecher, 2000; Jovanovic *et al.*, 1998). These compounds can also modulate a wide range of mammalian enzyme activities, such as cytochrome P450 and antioxidant enzymes (see Ferguson, 2001). Thus, it is probable that the antioxidant activities elicited by the Bt-AE as well as the antigenotoxic effect against oxidative DNA damages were at least in part due to the antioxidant action of the flavonoids.

Furthermore, Bt-AE did not induce cytotoxicity to bone marrow cells, even at the highest dose (Table 3). In a recent study, a hydroethanolic extract of *B. trimera* was not able to induce changes in hematological parameters in female rats, although toxicity was observed in kidney and liver of the animals also (Grance *et al.*, 2008). Other studies have reported low toxicity by *B. trimera*, differently from other species such as *B. dracunculifolia* (Fukuda *et al.*, 2006; Funari *et al.*, 2007) and *B. coridifolia* (Jarvis *et al.*, 1996; Monks *et al.*, 2002, Varaschin and Alessi, 2003). Low cytotoxicity was observed for *B. trimera* against tumor cell lines (Monks *et al.*, 2002). In rodents, extracts of *B. trimera* did not reveal toxic effect (Torres *et al.*, 2000). Here, the female mice showed normal behavior, without signs of toxicity.

However, Bt-AE was able to increase micronucleus frequency in bone marrow after treatment of mice for three consecutive days (Table 3). The micronucleus assay is a cytogenetic assay, which was performed to measure clastogenic/aneugenic effects caused by the treatment with Bt-AE. The results indicate mutagenic effect at chromosomal level. Previously published studies have shown mutagenic effects of green propolis from *B. dracunculifolia* in Chinese hamster ovary cells (Tavares *et al.*, 2006) and in mice at high doses, which were attributed to the presence of polyphenols (Pereira *et al.*, 2008). Thus, the mutagenicity by *B. trimera* could also be attributed to the clastogenicity of polyphenols. This finding should be taken into account when considering the consumption of high doses *B. trimera* extracts.

The present study showed that *B. trimera* not only produced some genotoxic and mutagenic effects, but also showed effectiveness in reducing the genotoxicity induced by H₂O₂, probably due to its antioxidant properties. Further mutagenic assays are necessary to assure the safe use of *B. trimera* in human.

5. Acknowledgements

This work was supported by ULBRA (Universidade Luterana do Brasil), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), and FAPERGS (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul) grant Casadinhos 0619795, Brazil.

6. References

- Borella, J.C., Donata P.D., Novaretti, A.G., Menezes Jr, A., França, S.C., Rufato, Pierre, C. B., Santos, A. S., Veneziani, R.C.S., Lopes, N.P., 2006. Variabilidade sazonal do teor de saponinas de *Baccharis trimera* (Less.) DC. (Carqueja) e isolamento de flavona. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 16, 557-561.
- Brendler-Schwaab S, Hartmann A, Pfuhrer S, Speit G. 2005. The *in vivo* comet assay: use and status in genotoxicity testing. *Mutagenesis* 20, 245-54.
- Brighente, I.M.C., Dias, M., Verdi, L.G., Pizzolatti, M.G., 2007. Antioxidant Activity and Total Phenolic Content of Some Brazilian Species. *Pharmaceutical Biology* 45, 156 – 161.
- Brozmanová J, Dudás A, Henriques JAP. 2001. Repair of oxidative DNA damage – an important factor reducing cancer risk. *Neoplasma* 48, 85-93.
- Costa, R.J., Diniz, A., Mantovani, M.S., Jordão, B.Q., 2008. *In vitro* study of mutagenic potential of *Bidens pilosa* Linné and *Mikania glomerata* Sprengel using the comet and micronucleus assays. *Journal of Ethnopharmacology* 118, 86-93.
- Ferguson L.R., 2001. Role of plant polyphenols in genomic stability, Mutation. Research, 475: 89-111.
- Fukuda, M., Ohkoshi, E., Makino, M., Fujimoto, Y., 2006. Studies on the Constituents of the Leaves of *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae) and their Cytotoxic Activity. *Chemical Pharmaceutical Bulletin* 54, 1465 -1468.
- Funari, C.L., Ferro, V.O., Mathor, M.B., 2007. Analysis of propolis from *Baccharis dracunculifolia* DC. (Compositae) and its effects on mouse fibroblasts. *Journal of Ethnopharmacology* 111, 206–212.

- Gene, R.M.C., Cartana, T., Adzet, E, Marin, T., Parella, S.C., 1996. Anti-inflammatory and analgesic activity of *Baccharis trimera*: Identification of its active constituents. *Planta Medica* 62, 232–235.
- Grance, S. R.M., Teixeira, M.A., Leite, R.S., Guimarães, E.B., Siqueira, J.M., Filiu, W.F. O., Vasconcelos, S.B.S., Vieira, M.C., 2008. *Baccharis trimera*: Effect on hematological and biochemical parameters and hepatorenal evaluation in pregnant rats. *Journal of Ethnopharmacology* 117, 28-33.
- Harborne, J. B., 1998. *Phytochemical Methods*. Clarendon Press, Oxford, p.295.
- Horn, R.C., Vargas, V.M.F., 2008. Mutagenicity and antimutagenicity of teas used in popular medicine in the *salmonella*/microsome assay. *Toxicology in Vitro* 22, 1043-1049.
- Januário, A.H., Santos, S.L., Marcussi, S., Mazzi, M.V., Pietro, R.C.L.R., Sato, D.N., Ellena, J., Sampaio, S.V., França, S.C., Soares, A.M. 2004. Neo-clerodane diterpenoid, a new metalloprotease snake venom inhibitor from *Baccharis trimera* (Asteraceae): Anti-proteolytic and anti-hemorrhagic properties. *Chemico-Biological Interactions* 150, 243-251.
- Jarvis, B.B., Wang. S., Cox. C., Rao. M.M., Philip, V., Varaschin, M.S., Barros. C.S., 1996. Brazilian *Baccharis* toxins: livestock poisoning and the isolation of macrocyclic trichothecene glucosides. *Natural Toxins* 4, 58–71.
- Jovanovic, S.V., Steenken, S., Simic, M.G., Hara, Y., 1998. Antioxidant properties of flavonoids: reduction potentials and electron transfer reaction of flavonoid radicals. In Rice Evans C.Parcker L Ed. *Flavonoid in Health and Disease*, New York: Marcel Dekker: p.137-61.

- Mavournin, K.H., Blakey, D.H., Cimino, M.C., Salamone, M.F., Heddle, J.A., 1990. The *in vivo* micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the US Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutation Research* 239, 29–80.
- Mendes, F.R., Tabach, R., Carlini, E.A., 2007. Evaluation of *Baccharis trimera* and *Davilla rugosa* in tests for adaptogen activity. *Phytotherapy Research* 21, 517-22.
- Merken, H.M., Beecher, G.R., 2000. Measurement of food flavonoids by high performance liquid chromatography. *Journal Agricultural Food Chemical* 48, 577-99.
- Monks, N.R., Bordignon, S.A.L., Ferraz, A., Machado, K.R., Faria, D.H., Lopes, R.M., Mondin, C.A., Souza, I.C.C., Lima, M.F.S., Rocha, A.B., Schwartsmann, G., 2002. Anti-tumour Screening of Brazilian Plants. *Pharmaceutical Biology* 40, 494 - 500.
- Nadin, S.B., VARGAS-ROIG, L.M., CIOCCA, D.R., 2001. A silver staining method for single-cell gel assay. *Journal Histochemical Cytochemical* 49, 1183– 1186.
- Oliveira, S.Q., Dal-Pizzol, F., Gosmann, G., Guillaume, D., Moreira, J.C.F., Schenkel, E.P., 2003. Antioxidant Activity of *Baccharis articulata* Extracts: Isolation of a New Compound with Antioxidant Activity Free Radical. *Research* 37, 555 – 559.
- Oliveira, S.Q., Dal-Pizzol, F., Moreira, J.C.F., Schenkel, E.P., Gosmann, G. 2004. Antioxidant activity of *Baccharis spicata*, *Baccharis trimera* and *Baccharis usterii*. *Acta Farmaceutica Bonaerense* 23, 365-368.
- Owen, R.W., Wimonwatwatee, T., Spiegelhalder, B., Bartsch, H., 1996. A high performance liquid chromatography method for quantification of hydroxyl radical formation by determination of dihydroxy benzoic acids. *European Journal of Cancer Prevention* 5, 233-240.

- Owen, R.W., Giacosa, A., Hull, W.E., Haubner, R., Spiegelhalder, B., Bartsch, H. The antioxidant/anticancer potential of phenolic compounds isolated from olive oil. *European Journal of Cancer*, v. 36, p. 1235-1247, 2000.
- Owen, R.W., Haubner, R., Mier, W., Giacosa, A., Hull, W. E., Spiegelhalder, B., Bartsch, H. Isolation, structure elucidation and antioxidant potential of the major phenolic and flavonoid compounds in brined olive drupes. *Food and Chemical Toxicology*, v. 41, p. 703-717, 2003.
- Pereira, A.D., Andrade, S.F., Swerts, M.S.O., Maistro, E. L., 2008. First *in vivo* evaluation of the mutagenic effect of Brazilian green propolis by comet assay and micronucleus test. *Food and Chemical Toxicology* 46, 2580–2584.
- Pereira, P., Tysca, D., Oliveira, P., Brum, L.F.S., Picada, J.N., Ardenghi, P., 2005. Neurobehavioral and genotoxic aspects of rosmarinic acid. *Pharmacology Research* 52, 199–203.
- Picada, J.N., Da Silva, K.V., Erdtmann, B., Henriques, A.T., Henriques, J.A., 1997. Genotoxic effects of structurally related beta-carboline alkaloids. *Mutation Research* 379, 135–149.
- Picada, J.N., Flores, D.G., Zettler, C.G., Marroni, N.P., Roesler, R., Henriques, J.A.P., 2003. DNA damage in brain cells of mice treated with an oxidized form of apomorphine. *Molecular Brain Research* 114, 80–85.
- Sanyal, R., Darroudi, F., Parzefall W., Nagao M., Knasmuller S. 1997. Inhibition of the genotoxic effects of heterocyclic amines in human derived hepatoma cells by dietary bioantimutagens. *Mutagenesis*, 12, 297-303.

- Saito, S.T., Gosmann, G., Saffi, J., Presser, M., Richter, M.F., Bergold, A.M., 2007. Characterization of the constituents and antioxidant activity of Brazilian green tea (*Camellia sinensis* var. *assamica* IAC-259 cultivar) extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 14, 9409–9414.
- Sharp, H., Bartholomew, B., Bright, C., Latif, Z., Sarker, S.D., Nash, R.J., 2001. 6-Oxygenated flavones from *Baccharis trinervis* (Asteraceae). *Biochemical Systematics and Ecology* 29, 105-107.
- Silva, F.G., Januário, A.H., Pinto, J.E.B.P., Nascimento, V.E., Barizan, W.S., Sales, J.F., Franca, S.C., 2006. Flavonoids content in native and cultivated populations of "carqueja" [*Baccharis trimera* (Less.) DC.] harvested at dry and humid season. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais* 8, 19-25.
- Soicke, H., Peschlow, E.L., 1987. Characterisation of flavonoids from *Baccharis trimera* and antihepatotoxic properties. *Planta Medica* 53, 37-9.
- Stopper, H., Eckert, I., Wagener, P., Schulz, W.A., 1997. Formation of micronuclei and inhibition of topoisomerase II in the comet assay in mammalian cells with altered DNA methylation. *Recent results in cancer research* 143, 183–193.
- Tapia, A., Rodriguez, J., Theoduloz, C., Lopez, S., Feresin, G.E., Hirschmann, G.S., 2004. Free radical scavengers and antioxidants from *Baccharis grisebachii*. *Journal of Ethnopharmacology* 95, 155–161.
- Tavares, D.C., Barcelos, G.R.M., Silva, L.F., Tonin, C.C.C., Bastos, J.K., 2006. Propolis-induced genotoxicity and antigenotoxicity in Chinese hamster ovary cells. *Toxicology. In Vitro* 20, 1154–1158.

- Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, Y., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.C., Sasaki, Y.F., 2000. Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. *Environmental and molecular mutagenesis* 35, 206–221.
- Torres, L.M.B., Gamberini, M.T., Roque, N.F., Lima-Landman, M.T., Souccar, C., Lapa, A. J., 2000. Diterpene from *Baccharis trimera* with a relaxant effect on rat vascular smooth muscle. *Phytochemistry* 55, 617±619.
- Varaschin, M.S., Alessi, A.C., 2003. Poisoning of mice by *Baccharis coridifolia*: an experimental model. *Veterinary and Human Toxicology* 45, 42–44.
- Verdi, L.G., Brighente, I.M.C., Pizzolatti, M.G., 2005. Gênero *Baccharis* (ASTERACEAE): Aspectos Químicos, Econômicos e Biológicos. *Química Nova* 28, 85-94.
- Wagner, H., Bladt, S., 1996. Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas. Springer-verlag, Berlin, p. 369.
- Yamaguchi, T., Takamura, H., Matoba, T., Terao, J., 1998. HPLC method for evaluation of the free radical-scavenging activity of foods by using 1.1-diphenil-2-picrylhidrazyl. *Biosciences Biotechnology and Biochemistry* 62, 1201-1204.

Table 1. DNA damage index analyzed in peripheral blood sampled 3 h and 24 h from mice treated with saline or a single dose of Bt-AE (500, 1000 or 2000 mg/kg).

	Saline	500 mg/kg	1000 mg/kg	2000 mg/kg
Blood 3 h	34.7 ± 11.20	61.9 ± 35.50	68.7 ± 40.90**	84.2 ± 53.60 **
Blood 24 h	32.90 ± 23.00	30.70 ± 24.30	41.40 ± 25.30	30.50 ± 16.60

Damage Index, can range from 0 (completely undamaged 100 cells x 0) to 400 (with maximum damage 100 cells x 4)

**P<0.01, statistically significant difference from the saline group (ANOVA. Tukey' test).

Table 2. DNA damage index analyzed in peripheral blood and liver from mice treated for three consecutive days with saline or 500, 1000 or 2000 mg/kg of Bt-AE and sacrificed 24 h after the last administration. Hydrogen peroxide (H₂O₂ 0.20 mM) was used in the *ex vivo* condition.

	Saline	3 X 500 mg/kg	3 X1000 mg/kg	3 X2000 mg/kg
Blood				
Without H ₂ O ₂	45.30 ± 36.13	33.12 ± 17.03	36.60 ± 16.97	56.40 ± 29.85
With H ₂ O ₂	171.50 ± 50.33	90.77± 35.47**	86.77± 17.49**	156.00 ± 57.81
Liver				
Without H ₂ O ₂	63.5 ± 19.40	45.10± 16.10	47.80 ± 18.20	61.20 ± 21.20
With H ₂ O ₂	321.50 ± 33.19	257.11 ± 64.51	172.80 ± 87.32	273.12 ± 75.16

Damage Index, can range from 0 (completely undamaged 100 cells x 0) to 400 (with maximum damage 100 cells x 4)

**P<0.01, statistically significant difference from the saline group with H₂O₂ (ANOVA. Tukey' test).

Table 3. Mutagenic activity in bone marrow of mice treated with Bt-AE.

Group	Ratio (PCE/NCE)	
	Individual values	Per group (means \pm SD)
Saline	(1.42, 1.13, 1.29, 1.26, 1.45)	1.31 \pm 0.13
3 X 500 mg/kg	(1.12, 1.43, 1.33, 1.01, 1.14)	1.20 \pm 0.17
3 X 1000 mg/kg	(1.47, 1.38, 1.20, 1.30, 1.04)	1.28 \pm 0.16
3 X 2000 mg/kg	(1.28, 2.01, 1.45, 1.02, 1.02)	1.36 \pm 0.40
Positive control	(0.98, 1.14, 1.17, 1.60, 1.90)	1.36 \pm 0.38
Micronucleated polychromatic erythrocytes in 2000 PCE		
Saline	(3, 4, 5, 8, 4)	4.80 \pm 1.92
3 X 500 mg/kg	(7, 9, 8, 8, 9)	8.20 \pm 0.83
3 X 1000 mg/kg	(9, 9, 6, 12, 11)	9.40 \pm 2.30**
3 X 2000 mg/kg	(11, 10, 9, 9, 10)	9.80 \pm 0.83**
Positive control	(32, 61, 33, 77, 56)	51,80 \pm 19,20***

Positive control: cyclophosphamide (2 X 25 mg/kg).

Significant difference: *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001 (ANOVA. Tukey test).

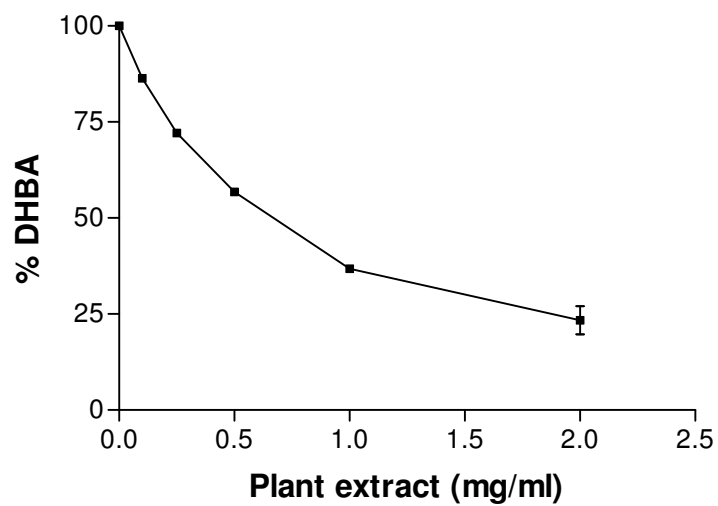
Table 4: Inhibition of DPPH. IC₅₀ values for the DPPH assay of Bt-AE, rutin and ascorbic acid as well as the AEAC.

Sample	Inhibition (%)				IC ₅₀ (µg/mL)	AEAC(µg/g)
Concentration	1 µg/ml	10 µg/ml	100 µg/ml	1000 µg/ml		
Ascorbic acid	9.70	98.11	99.40	99.62	4.03 ± 0.16	1.0000
Rutin	7.53	36.51	88.23	96.72	18.93 ± 0.76	0.2128
Bt-AE	3.89	10.58	53.29	90.72	92.39 ± 4.29	0.0436

Mean of three determinations (standard deviation in parentheses). Differences at $p < 0.05$ were considered to be significant. Results were based on the values measured at 20 min. Ascorbic acid and rutin were used as positive controls. AEAC (Ascorbic acid Equivalent Antioxidant Capacity).

Legend for figure

Figure 1. Inhibition of the generation of reactive oxygen species by Bt-AE in the hypoxanthine/xanthine oxidase system. Data points are presented as mean \pm SD (n=3).



IV – DISCUSSÃO GERAL

O uso milenar de plantas medicinais mostrou que determinadas plantas apresentam substâncias potencialmente tóxicas. A partir disto estudos revelaram que alguns gêneros de plantas podem apresentar tanto espécies com propriedades terapêuticas como tóxicas (VERDI *et al.*, 2005). O uso indiscriminado de plantas, tidas como medicinais, com pouca ou nenhuma comprovação de suas propriedades farmacológicas, muitas vezes, é a causa de graves intoxicações. Apesar da presença de vários compostos bioativos, observados em *B. dracunculifolia* e *B. trimera*, não se tem conhecimento de nenhum estudo sobre os efeitos genotóxicos *in vivo* destas plantas. Dessa maneira, há a necessidade de um estudo genotóxico e/ou antigenotóxico e mutagênico do extrato aquoso de partes aéreas de *B. dracunculifolia* e *B. trimera*.

A caracterização fitoquímica das partes aéreas, secas e moídas de *B. dracunculifolia* e *B. trimera*, foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Simões e colaboradores (2005). Estes ensaios visam caracterizar a presença dos principais grupos de metabólitos secundários como: alcalóides, antraquinonas, cardiotônicos, cumarinas, flavonóides, saponinas, taninos. Os extratos aquosos das partes aéreas de *B. dracunculifolia* (EA-d) e *B. trimera* (EA-t) foram avaliados quanto a genotoxicidade/antigenotoxicidade através do ensaio cometa (EC) (TICE *et al.*, 2000; PICADA *et al.*, 2003) e mutagenicidade através do teste de micronúcleos (MN) (MAVOURNIN *et al.*, 1990; STOPPER *et al.*, 1997). Para estes experimentos, ambos os extratos foram administrados em camundongos CF-1 fêmeas (4 grupos de 10 animais) nas doses 500 mg/kg, 1000 mg/kg e 2000 mg/kg, tratados por 3 dias consecutivos. O grupo controle (CN) recebeu solução de NaCl 0,9 %. A amostra de sangue periférico (SP) foi coletada 3h, 24h e 72h após a primeira administração do extrato. Amostra de tecido hepático também foi coletada após o sacrifício dos animais. Para avaliação da atividade genotóxica foi utilizada a versão alcalina do EC (PH>13), e para verificar o efeito antigenotóxico foi utilizado peróxido de hidrogênio (H₂O₂; 0,25 mM) em tratamento *ex vivo*. Para avaliação da atividade mutagênica foi feita à extração da medula óssea dos fêmures dos animais através do teste de micronúcleo (MN) e para controle positivo foi utilizado ciclofosfamida (20mg/kg), administrada via intraperitoneal. A verificação da

atividade antioxidante, foi realizada através dos ensaios *in vitro*, da hipoxantina/xantina oxidase (OWEN *et al.*, 1996) e DPPH (YAMAGUCHI *et al.*, 1998).

Na análise fitoquímica realizada com as partes aéreas de ambas as plantas, foram detectados, somente saponinas e flavonóides. Cumarinas, taninos, antraquinonas, cardiotônicos e alcalóides não foram encontrados tanto em *B. dracunculifolia* quanto em *B. trimera*. A ocorrência de saponinas observada em ambas as espécies está de acordo com a literatura que relata a ocorrência de saponinas no gênero *Baccharis* (GENE *et al.*, 1996; BUDEL *et al.*, 2004; BORELLA *et al.*, 2006). Em estudo com extrato aquoso de *B. trimera*, Gene e colaboradores (1996) identificaram através de ensaios cromatográficos, a presença de saponinas formadas pelo ácido equinocístico como principais compostos bioativos. Além disso, a presença do flavonóide rutina também foi verificada por esses mesmos autores. Borella e colaboradores (2006) em estudo com *B. trimera* em diferentes períodos sazonais, verificaram que esta espécie vegetal não é sensível às alterações sazonais, no que se refere à biossíntese de saponinas. Entretanto, quanto ao teor de flavonóides, Borella e Fontoura (2002) observaram um efeito sazonal, obtendo um maior teor de flavonóides na colheita de verão. Outros estudos revelam a ocorrência de flavonóides no gênero *Baccharis* (SOICKE *et al.*, 1987; ZDERO *et al.*, 1991; LIU *et al.*, 1993; SHARP *et al.*, 2001; MOREIRA *et al.*, 2003; VERDI *et al.*, 2005), bem como em ambas as espécies desse estudo (BOHLMANN e ZDERO, 1969; HERZ *et al.*, 1977; TORRES *et al.*, 2000; ALENCAR *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2006; RESENDE *et al.*, 2007). Resende e colaboradores (2007) através de estudos com extrato de acetato etila de *B. dracunculifolia*, verificaram por HPLC a presença de compostos fenólicos como ácido cafêico, ácido p-cumárico, aromadendreno-4'-O-metil eter, 3-prenil-ácido p-cumárico (drupanina), 3,5-diprenil- ácido p-cumárico (artepillin C) e baccharina. Alencar e colaboradores (2005) em estudo fitoquímico comparativo entre o extrato metanólico das folhas de *B. dracunculifolia* e da própolis, obtida dessa espécie, constataram que os compostos fenólicos, principalmente, artepilin C e derivados do ácido cinâmico estão presente tanto *B. dracunculifolia* como na própolis. Em análise quantitativa do teor de flavonóides em partes aéreas de *B. trimera*, Silva e colaboradores (2006) observaram em espécies nativas e silvestres a presença das flavonas como 5,3'-dihidróxi-4', 6,7-trimetóxi-flavona e 5-hidróxi-3',4',6,7-tetrametóxi-flavona, no entanto, há maior

concentração das flavonas 5-hidróxi-3',4',6,7-tetrametóxi-flavona em espécies silvestres. Torres e colaboradores (2000) trabalhando com a fração clorofórmica de partes aéreas de *B. trimera*, isolaram e identificaram o flavonóide denominado eupatorina.

A análise dos dados encontrados pelo teste de MN (Tabela 1 do item 3) mostra que o extrato aquoso de *B. trimera* foi mutagênico nas doses 1000 mg/kg e 2000 mg/kg, quando comparado ao grupo controle. Entretanto EA-d nas três doses do extrato (500 mg/kg, 1000 mg/kg e 2000 mg/kg) induziu atividade mutagênica estatisticamente significativa. Relacionando os dois extratos EA-d é aproximadamente três vezes mais mutagênica que EA-t (Tabela 1 do item 3). A ação mutagênica de ambas as plantas pode estar relacionada a doses muito altas de ambos os extratos utilizados nesse estudo. Contrariando nossos resultados, Resende e colaboradores (2007), utilizando sangue periférico e medula óssea de ratos tratados com 24 mg/kg do extrato de *B. dracunculifolia* na fração de acetato etila, observaram significativa atividade antimutagênica 24h e 48h após a administração do extrato. Além disso, atividade mutagênica não foi observada em sangue periférico e medula óssea de ratos tratados.

Ainda verifica-se que, EA-d é citotóxica na dose mais alta (2000 mg/kg), enquanto que EA-t não demonstrou este efeito, quando comparadas ao grupo controle. Alguns trabalhos relatam efeitos citotóxicos de substâncias presentes nos extratos de *Baccharis dracunculifolia* como também da própolis verde, obtida a partir dessa espécie (ALENCAR et al., 2005; FUKUDA et al., 2006; FUNARI et al., 2007). De acordo com a literatura, *B. dracunculifolia* possui entre seus constituintes químicos o composto farnesol (ALENCAR et al., 2005), que é descrito como citotóxico (VOZIYAN et al., 1995). Em estudo com extrato de *B. dracunculifolia* e com compostos isolados da classe dos monoterpenos e sesquiterpenos, Fukuda e colaboradores (2006) observaram efeitos citotóxicos significantes em células sanguíneas, tanto do extrato metanólico como dos compostos isolados. Através de ensaios *in vitro* Funari e colaboradores (2007) constataram efeito citotóxico da própolis verde na concentração de 31,25 µg/ml, em fibroblastos (NIH-3T3) de camundongos. Entretanto, segundo consta na literatura, *B. trimera* tem demonstrado baixa citotoxicidade tanto em células tumorais (MONKS et al., 2002) como em testes com roedores (TORRES et al., 2000). Em outro estudo, Grance e colaboradores (2008)

verificaram que o extrato etanólico de *B. trimera* (8,4 mg/kg) não foi citotóxico para células sanguíneas. Porém, foram verificados por esses mesmos autores, efeitos citotóxicos dessa planta em células renais e do fígado de ratas no período de gestação.

A análise dos resultados obtidos através do Ensaio Cometa com os extratos de ambas as plantas em SP 3h mostrou um aumento significativo no índice de dano (ID) no DNA das células, como podemos observar na Tabela 3 (item 3). Através destes resultados, observou-se um efeito de forma dose-dependente para EA-t, entretanto EA-d apresentou resultados significativos apenas na dose de 1000 mg/kg. Por outro lado, nas amostras de SP 24h de EA-d e EA-t estes efeitos não foram significativos, indicando reparo nos danos ao DNA (Tabela 3, item 3). Na Tabela 4 (item 3), observou-se que o EA-d aumentou significativamente o ID no DNA das células tratadas com H₂O₂ em SP 3h. Este resultado também foi verificado nas amostras de SP e fígado após 72h de tratamento (Tabela 5 do item 3). Resultado semelhante foi observado por Pereira e colaboradores (2008) em estudo com a própolis verde nas doses 1000, 1500 e 2000 mg/kg. Nesse estudo, os autores verificaram através do ensaio cometa que a própolis verde induziu significativamente danos no DNA das células de sangue periférico de camundongos em 4h e 24h após administração do extrato de própolis. Por outro lado, EA-t apresentou efeito protetor (Tabela 6 do item 3) no DNA das células tratadas com H₂O₂ em SP 72h nas doses de 500 mg/kg e 1000 mg/kg e reduziu o ID no fígado 72 h. Como esse efeito de proteção no DNA das células pode estar relacionado a uma ação antioxidante, foram realizados os ensaios de xantina oxidase e DPPH para avaliar esta propriedade de ambos os extratos.

No teste hipoxantina/xantina oxidase *in vitro*, ambas as plantas mostraram significativa atividade antioxidante de forma dose-dependente, conforme mostra a Figura 1 do item 3. Entretanto, EA-t mostrou maior atividade antioxidante (IC₅₀ = 0,69 mg/mL) sobre radicais livres, reduzindo a formação de ambos compostos de DHBA em 76,6%, enquanto que EA-d (IC₅₀ = 0,85 mg/mL) teve uma atividade antioxidante semelhante, mas levemente menor, reduzindo a formação de ambos os compostos de DHBA em 73,6% com a mesma concentração de EA-t (2 mg/mL). Nos testes de DPPH ambas os extratos (EA-t, EA-d) apresentaram atividade sobre os radicais livres, também de forma dose-dependente (Tabela 7 do item 3). Neste teste, o extrato EA-d mostrou maior atividade na inibição do

radical livre DPPH (91,8%), enquanto que EA-t inibiu em somente 90,7%, na concentração de 1000 $\mu\text{g/ml}$ e 55,5% e 53,3%, respectivamente, para a concentração de 100 $\mu\text{g/ml}$ de extrato no ensaio. Além disso, a IC_{50} (concentração necessária para inibição/inativação de 50% dos radicais livres DPPH no meio) dos extratos das folhas e flores de ambas as plantas (Tabela 7 do item 3), EA-t demonstrou uma atividade menor com um valor de IC_{50} (92,39 $\mu\text{g/mL} \pm 4,29 \mu\text{g/mL}$) em relação ao valor de EA-d, IC_{50} (91,81 $\mu\text{g/mL} \pm 4,06 \mu\text{g/mL}$). O valor da IC_{50} de ambos os extratos é bem maior, em comparação ao controle positivo que foi 4,03 $\mu\text{g/mL} \pm 0,16$ para ácido ascórbico e 19,59 $\mu\text{g/mL} \pm 0,76$ para o composto rutina. O fato do EA-t demonstrar efeito antioxidante maior que EA-d no teste a base da hipoxantina/xantina oxidase é coerente, pois foi observado seu efeito protetor ao DNA de células tratadas com peróxido de hidrogênio (SP 72h e fígado 72h) no ensaio cometa (Tabela 6 do item 3). Segundo Resende e colaboradores (2007) a atividade antioxidante do extrato de *B. dracunculifolia* estaria relacionada a presença de compostos fenólicos como ácido cafêico, ácido p-cumárico, aromadendreno-4'-*O*-metil-éter, 3-prenil-ácido p-cumárico (drupanina), 3,5-diprenil- ácido p-cumárico (artepillin C) e baccharina. Oliveira e colaboradores (2004) em estudo com extrato de *B. trimeria* e frações, na concentração de 25 $\mu\text{g/mL}$, observam através do ensaio de TBARS significativa atividade antioxidante sob peroxidação lipídica de células tratadas com peróxido de hidrogênio, inibindo a formação de espécies que reagem com ácido Tiobarbitúrico.

Os resultados observados através do Ensaio Cometa e teste de MN realizados com os extratos de *B. dracunculifolia* e *B. trimeria*, demonstraram a importância de estudos genotóxicos e mutagênicos em plantas de uso popular. Como observado, *B. dracunculifolia* demonstrou ser mais mutagênica e citotóxica quando comparada ao extrato de *B. trimeria* indicando um maior risco no consumo desta planta. *B. trimeria* induziu genotoxicidade em SP depois de três horas após administração de 2000 mg/Kg. Porém o efeito genotóxico não foi observado após a administração das três doses consecutivas do extrato, sugerindo que eventuais danos induzidos no DNA podem ser reparados. Além disso, *B. trimeria* demonstrou efeitos antígenotóxico possivelmente por mecanismos antioxidantes, os quais foram observados através do ensaio de DPPH e hipoxantina/xantina oxidase *in vitro*. Essa atividade pode estar relacionada com a presença de flavonóides. Entretanto, apesar das duas espécies apresentarem um perfil fitoquímico semelhante e atividade antioxidante

similar, *B. dracunculifolia* foi citotóxica e genotóxica. Essas atividades induzidas pelo extrato de *B. dracunculifolia*, podem estar relacionadas com a presença de sesquiterpenos tóxicos presente no extrato dessa planta como farnesol (Voziyan et al., 1995) e p-cimino-2,3-diol e α -hidróxieu-desma-4(15),7-dieno (Fukuda et al., 2006).

Com os resultados obtidos nesse trabalho, torna-se necessário a identificação e quantificação dos flavonóides presente nos extratos, assim como a identificação de outros compostos bioativos.

V. CONCLUSÃO

De acordo com os dados obtidos neste trabalho foi possível concluir que:

- Através dos ensaios fitoquímicos pode-se sugerir a presença de saponinas e flavonóides em ambas as plantas.
- No ensaio cometa *in vivo*, *B. draunculifolia* foi genotóxica tanto após a administração de uma única dose do extrato quanto após três doses repetitivas, enquanto que *B. trimera* foi genotóxica só após a primeira administração, mas de forma dose-dependente.
- Na avaliação antigenotóxica, *B. trimera* demonstrou efeito protetor, diminuindo danos no DNA das células sanguíneas tratadas *ex vivo* com peróxido de hidrogênio, enquanto que *B. dracunculifolia* não teve efeito protetor.
- No teste micronúcleos de medula óssea, ambos os extratos demonstraram atividade mutagênica, porém, observou-se que *B. dracunculifolia* foi três vezes mais mutagênica que *B. trimera*, além de ter demonstrado atividade citotóxica.
- No teste hipoxantina/xantina oxidase, ambas as plantas demonstraram atividade antioxidante de forma dose-dependente, porém *B. trimera* (76,6%) teve uma atividade antioxidante maior que *B. dracunculifolia* (73,6%).
- Nos testes de DPPH, ambas as plantas demonstraram atividade sobre os radicais livres de forma dose-dependente, porém, *B. dracunculifolia* mostrou maior atividade.

VI. PERSPECTIVAS

Outros testes serão realizados para complementar o estudo das plantas *B. dracunculifolia* e *B. trimera*.

- Verificar a atividade genotóxica/antigenotóxica e mutagênica/antimutagênica das frações

- Avaliar a ação genotóxica de ambos os extratos, expressa como mutação pontual e cromossômica, assim como recombinação mitótica, através do teste para detecção de mutação e recombinação (SMART) em *Drosophila melanogaster*.

- Analisar parâmetros oxidativos através do teste da atividade da catalase e TBARS em amostras de tecidos de camundongos tratados com o extrato bruto e frações de ambas as plantas.

V – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALENCAR, S.M.; AGUIAR, C.L. GUZMÁN, J.P.; PARK, Y.K. *Composição química de Baccharis dracunculifolia, fonte botânica das própolis dos estados de São Paulo e Minas Gerais. Ciência Rural*, Santa Maria, v. 35, n. 4, p. 909-915, 2005.

ALICE, C.B.; SIQUEIRA, N.C.S.; MENTZ, L.A.; SILVA, G.A.A.B.; JOSÉ, K.F.D. *Plantas Medicinais de Uso Popular: atlas farmacognóstico*. ed. ULBRA, Canoas, 1995. 208p.

AVANCINI, A.C.M; WIEST, J.M.; MUNDSTOCK, E. Atividade bacteriostática e bactericida do decocto de *Baccharis trimera* (Less.) D.C., Compositae, carqueja, como desinfetante ou anti-séptico. *Arquivo Brasileiro Medicina Veterinaria Zootecnia*, v.3, p.52, 2000.

BARBOSA, P.D. Mecanismo de Ação da Hispidulina sobre o Metabolismo Energético Mitocondrial e Análise Comparativa das Propriedades Antioxidantes da Hispidulina e Eupafolina, PR. Curitiba, 2003. Tese (Mestrado em Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

BIASI, L.M.; BONA, C.M. Propagação de Carqueja (*Baccharis trimera* (Less.) A.P. de Candolle) por meio de Estaquia. *Revista Brasileira Planta medica*, n2, v.2, p.37-43, 2000.

BOHLMANN, F.; ZDERO, C. Über neue Terpendervivate aus *Baccharis trimera*. *Tetrahedron Letters*, v.28, p. 2419-2421, 1969.

BOLDT, P.E. *Baccharis* (Asteraceae) a review of its taxonomy, phytochemistry, ecology, economic status. College Station, Texas, The Texas A & M University System, 1989.

BORELLA, J.C.; DUARTE, D.P.; NOVARETTI, A.A.G.; MENEZES JR, A.; FRANÇA, S.C.; RUFATO, C.B.; SANTOS, P. A.S.; VENEZIANI, R. C.S.; LOPES, N. P. Variabilidade sazonal do teor de saponinas de *Baccharis trimera* (Less.) DC (Carqueja) e isolamento de flavona. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, v.16, n.4, p.557-561, 2006.

BORELLA, J.C.; FONTOURA, A. Avaliação do perfil cromatográfico e do teor de flavonóides em amostras de *Baccharis trimera* (Less.) DC. Asteraceae (carqueja) comercializadas em Ribeirão Preto, SP, Brasil. *Revista Brasileira de farmacognosia*, v12, n.2, p.63-67, 2002.

BROZMANOVÁ, J., DUDÁS, A., HENRIQUES, J.A.P. *Repair of oxidative DNA damage – an important factor reducing cancer risk. Minireview. Neoplasma*. 2001; 48(2): 85-93.

BRUHN, J.G.; HOLMSTEDT, B. Ethnopharmacology, Objectives, Principles and Perspectives. in: BEAL, J.L.; REINHARD, E. Natural products as medicinal agents. Stuttgart: Hippokrates, p.405-430, 1982.

BRUNETON, J. Pharmacognosie – phytochimie, plantes medicinales. Paris: Lavoisier, 1993.

BUDEL, J.M.; DUARTE, M.R.; SANTOS, C.A.M. Parâmetros para análise de carqueja: comparação entre quatro espécies de *Baccharis spp.* (Asteraceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.14, p.41-48, 2004.

BURKART, A. FLORA ILUSTRADA DE ENTRE RIOS (ARGENTINA) parte VI. Buenos Aires, 1974, p.254-262.

BURDOCK, G.A. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis. *Food and Chemical Toxicology*, Oxford, n.4, v.36, p.347-363, 1998.

CALIXTO, J.B. Efficacy, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutics agents). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v.33, p.179-189, 2000.

CARVER, J.H.; CARRANO, A.V.; MARCGREGO, J.T. Genetic effects of the flavonoids quercetin, Kaempferol and galangin on Chinese hamster ovary cells in vivo. *Mutation Research*, v.133, p.45-60, 1983.

CASTALDO, S.; CAPASSO, F. Propolis, an old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia*, v.73, p.1-6, 2002.

CRAGG, G.M.; NEWMAN, D.J.; SNADER, K.M. Natural products in drug discovery and development. *Journal of Natural Products*, v.60, p.52-60, 1997.

CRAVEIRO, A.A.; MACHADO, M.I.L. De aromas, insetos e plantas. *Ciência Hoje*, n.23, v.4, p.54-63, 1986.

CORRÊA, A.M. P. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Imprensa Nacional, Rio de Janeiro, 1984, 174p.

CHOY, W.N. Regulatory genetic toxicology tests. In: Genetic Toxicology and Cancer Risk Assessment (Choy, WN Ed), Marcel Dekker, Inc. New York, p. 93 -113, 2001.

DIAS, B.F.S. A implementação da conservação sobre diversidade biológica no Brasil: desafios e oportunidades. Campinas, 1996, 10p.

DE STASI, L.C. (Org) Plantas Mediciniais: Arte e Ciência. Um guia de estudo Interdisciplinar. São Paulo: Unesp, Revista *Pharmacia Brasileira*, N° 36, p.62-66, 2003.

DE STASI, L.C.; HIRUMA LIMA, C.A. Plantas Mediciniais na Amazônia e na Mata Atlântica. Unesp, 2^o ed., São Paulo, 2002. 432p.

DA SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J.A.P. (Org).Genética Toxicológica. Porto Alegre: Alcance, 2003. 422p.

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

FUNARI, C.L; FERRO, V.O.; MATHOR, M.B. Analysis of propolis from *Baccharis dracunculifolia* DC.(Compositae) and its effects on mouse fibroblasts. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 111, p. 206–212, 2007.

FUKUDA, M.; OHKOSHI, E.; MAKINO, M.; FUJIMOTO, Y. Studies on the Constituents of the Leaves of *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae) and their Cytotoxic Activity. *Chemical Pharmacology Bull*, V. 54, 1465 -1468, 2006.

GAMBERINI, M.T.; SKORUPA, L.A.; SOUCCAR, C.; LAPA, A.J. Inhibition of gastric secretion by a water extract from *Baccharis triptera* Mart. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 86 (Suppl. II), p.137-139, 1991.

GEE, J.M.; DUPONT, M.S.; RHODES, M.J.C.; JOHNSON, I.T. Quercetin glucosides interact with the intestinal glucose transport pathway. *Free Radical Biology & Medicine*. n.1, v.25, pp.19-25, 1998.

GENE, R.M.; MARIN, E.; ADZET, T. Anti-inflammatory effect of aqueous extracts of three species of the genus *Baccharis*, *Planta Medica*, v.58, p.565–566, 1992.

GENE, R.M.; CARTANA, C.; ADZET, T.; MARIN, E.; PARELLA, T.; CANIGUERAL, S. Anti-inflammatory and analgesic activity of *Baccharis trimera*: Identification of its active constituents, *Planta Medica*. v.62, p.232–235, 1996.

GHISALBERTI, E. L. Própolis: a review. *Bee World, Cardiff*, n.2, v.60, p.59-84, 1979.

GRANCE, S.R.M.; TEIXEIRA, M.A.; LEITE, R.S.; GUIMARAES, E.B.; SIQUEIRA, J.M.; FILIU, W.F.O.; VASCONCELOS, S.B.S.V.; VIEIRA, M.C. *Baccharis trimera*: Effect on hematological and biochemical parameters and hepatorenal evaluation in pregnant rats. *Journal of Ethnopharmacology*, v.117, p.28-33, 2008.

HARAGUCHI, M. Plantas Tóxicas de Interesse na Pecuária. *Instituto Biológico*, São Paulo, v.65, p.37-39, 2003.

HARBORNE, Journal. B. Ecological biochemistry. 4. ed. London: Academic, 1993.

HARBORNE, J.B.; WILLIAMS, C.A. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, v.55, p. 481-504, 2000.

HARTMANN, A.; AGURELL, E.; BEEVERS, C.; BRENDLER-SCHWAAB, S.; BURLINSON, B.; CLAY, P. Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. *Mutagenesis*, v.18, p. 45-51, 2003.

HAYASHI, M.; TICE, R.R; MACGREGOR, J.T; ANDERSON, D.; BLAKEY, D.H.; KIRSCH; VOLDERS, M.; OLESON, F.B.JR; PACCHIEROTTI, F.; ROMAGNA, F.; SHIMADA, H.; SUTOU, S.; VANNIER, B. In vivo rodent erythrocyte micronucleus assay. *Mutation Research*, v.312, p.293-304, 1994.

HEIM K. E.; TAGLIAFERRO A. R.; BOBILYA D. J. Flavonoids antioxidants:chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry*, v. 13, p. 572-584, 2002.

HERZ, W.; PILOTTI, A.M.; SOÈDERHOLM, A.C.; SHUHAMA, I.K.; VICHNEWSKI, W. New ent-clerodane-type diterpenoids from *Baccharis trimera*. *Journal of Organic Chemistry*, n.42, v.24, p.3913±3917, 1977.

ISHIKAWA, M.; KANNO, S.; ASOU, K.; OGINO, M.; TADANO, T.; SATOU, S. Inhibition of growth and induction of apoptosis in human cancer cell lines by Propolis. *Journal of Pharmacological Sciences*, Kyoto, v.94, p.129-129, 2004.

JANUÁRIO, A.H.; SANTOS, S.L.; SILVANA, M.; MAZZI, M.V.; PIETRO, R.C.L.R.; SATO, D.N.; ELLENA, J.; SAMPAIO, S.V.; FRANC, A.S.C.; SOARES, A. M. Neo-clerodane diterpenoid, a new metalloprotease snake venom inhibitor from *Baccharis trimera* (Asteraceae): anti-proteolytic and anti-hemorrhagic properties. *Chemico-Biological Interactions*, v.150, p. 243-251, 2004.

JOLY, A. B. Botânica: introdução a taxonomia vegetal, 7ª ed., Cia Editora Nacional: São Paulo, 1967.

KIOKIAS, S.; VARZAKAS, T.; OREOPOULOU, V. *In vitro* activity of vitamins, flavonoids, and natural phenolic antioxidants against the oxidative deterioration of oilbased

systems. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition (JournalSeek)*, v. 48, n.1, p. 78-93, 2008.

KORBES, C.V. Manual de plantas medicinais, 48ª ed., Grafit: Francisco Beltrão, 1995.

KUMAZAWA, S.; HAMASAKA, T.; NAKAYAMA, T. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *Food Chemistry*, v.84, p.329-339, 2004.

KUMAZAWA, S.; YONEDA, M.; SHIBATA, I.; KANAEDA, J.; HAMASAKA, T.; NAKAYAMA, T. Direct evidence for the plant origin of Brazilian propolis by the observation of honeybee behavior and phytochemical analysis. *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, Tokyo, n.6, v.51, p.740-742, 2003.

LAPA, A.J.; FISCHMAN, L.A.; GAMBERINI, M.T.; 1992. Inhibitors of gastric secretion from Brazilian folk medicinal plants. In: Capasso, F., Mascolo, N. (Eds.), *Natural Drugs and the Digestive Tract*. EMSI, Roma, p. 63-68, 1992.

LEMO, 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, p.119-138, 2003.

LIU, Y.L.; TIMMERMANN, B.N.; HOFFMANN J.J.; MCLAUGHLIN, S.P. A flavonol triglycoside from *Baccharis thesioides*. *Phytochemistry*, v. 33, p.1549-1551, 1993.

LOAYZA, I.; ABUJDER, D.; ARANDA, R.; JAKUPOVIC, J.; COLLIN, G. DESLAURIERS, H.; JEAN, F.I. Essential Oils Of *Baccharis salicifolia*, *B.latifolia* and *B. dracunculifolia*. *Phytochemistry*, v.38, p.381-389, 1995.

LORENZI, H.; MATOS, F.J. DE ABREU. *Plantas Mediciniais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas*. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2002. 512p.

LOPES, M.I.L.; SAFFI, J.; ECHEVERRIGARAY, S.; HENRIQUES, J.A.P.; SALVADOR, M. Mutagenic and antioxidant activities of *croton lechleri sap* in biological systems. *Journal of Ethnopharmacology*, v.95, p.437-445, 2004.

MACIEL, M.A.M; PINTO, A.C.; VEIGA JR., V.F. *Plantas Mediciniais: A Necessidade de Estudos Multidisciplinares*. *Química Nova*, n.3, v. 25, 2002.

MACGREGOR, J.T.; HEDDLE, J.A.; HITE, M.; MARGOLIN, B.H.; RAMEL, C.; SALAMONE, M.F.; TICE, R.R.; WILD, D. Guidelines for the conduct of micronucleus assays in mammalian bone marrow erythrocytes. *Mutation Research*, v.189, p.103-112, 1987.

MARCUCCI, M.C.; BANKOVA, V. Chemical composition, plant origin and biological activity of Brazilian propolis. *Current Topics in Phytochemistry*, v.2, p.115-123, 1999.

MARCUCCI, M.C.; FERRERES, F.; GARCIA-VIGUERA, C.; BANKOVA, V.S.; DE CASTRO, S.L.; DANTAS, A.P.; VALENTE, P.H.M.; PAULINO, N. Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. *Journal of Ethnopharmacology*. v.74, p.105-112, 2001.

MARRONI, N.P. Estresse oxidativo e antioxidante. In: DA SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HERRMANN, S.M. A Genotoxicidade dos flavonóides. Canoas Ed.ULBRA, 2002, 196p.

MATSUNO, T. O Efeito Terapeutico da Propolis. Nair Tazue Itice, Sao Paulo, 1997, 133p.

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.

MESQUITA, A.A.L.; CORRÊA, D.B.; DE PÁDUA, A.P.; GUEDES, M.L.O.; GOTTLIEB, O.R. Flavonoids from four *Compósitae* Espécies. *Phytochemistry*, v.25, p.1255-6, 1986.

MOREIRA, F.P.M.; COUTINHO, V.; MONTANHER, A.B.P.; CARO, M.S.B.; BRIGHENTE, I.M.C.; PIZZOLATTI, M.G.; MONACHE, F.D.; Flavonóides e triterpenos de *Baccharis pseudotenuifolia* – bioatividade sobre *Artemísia salina*. *Química Nova*, v.26, p.309-11, 2003.

MONTPIED, P.; DE BOCK, F.; RONDOUIN, G.; NIEL, G.; BRIANT, L.; COURSEAU, A.S.; LERNER-NATOLI, M.; BOCKAERT, J. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) prevents Inflammatory stress in organotypic hippocampal slice cultures. *Molecular Brain Research*, Amsterdam, n.2, v.115, p.111-120, 2003.

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.

NAGATANI, Y.; WARASHINA, T; NORO, T. Studies on the Constituents from the Aerial Part of *Baccharis dracunculifolia* DC. *Chemical & pharmaceutical bulletin.*, n. 49, v.11, p.1388-1394, 2001.

NAGATANI, Y.; WARASHINA, T; NORO, T. Studies on the Constituents from the Aerial Part of *Baccharis dracunculifolia* DC. II. *Chemical & pharmaceutical bulletin.* n.50, v.5, P. 583-589, 2002.

NAKASUGI, T.; KOMAI, K. Antimutagens in the Brazilian Folk Medicinal Plant Carqueja (*Baccharis trimera* Less.) *Journal Agricula Food Chemycal*, v.46, p.2560-2564, 1998.

NIERO, R.; MALHEIROS, A.; BITTENCOURT, C.M.S.; BIAVATTI, M.W.; LEITE, S.N.; CECHINEL FILHO, V. Aspectos químicos e biológicos de plantas medicinais e considerações sobre fitoterápicos. In: BRESOLIN, T.M.B.; CECHINEL FILHO, V. Ciências farmacêuticas: contribuição ao desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos. editora UNIVALI, p.239, 2003.

OLIVEIRA, A.C.P.; ENDRINGER, D.C.; AMORIM, L.A.S.; BRANDAO, M.G.L.; COELHO, M.M. Effect of the extracts and fractions of *Baccharis trimera* and *Syzygium cumini* on glycaemia of diabetic and non-diabetic mice. *Journal of Ethnopharmacology*, v.102, p. 465-469, 2005.

OLIVEIRA, S.Q.; DALPIZZOL, F.; MOREIRA, J.S.F.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G. Antioxidant activity of *Baccharis spicata*, *Baccharis trimera* and *Baccharis usterii*, *Acta Farm. Bonaerense*, v.23, n. 3, p. 365-8, 2004.

OWEN, R.W.; WIMONWATWATEE, T., SPIEGELHALDER, B. A high performance liquid chromatography system for quantification of hydroxyl radical formation by determination of dihydroxy benzoic acids. *European Journal of Cancer*, v. 5, p.233-240, 1996.

OWEN, R.W., SPIEGELHALDER, B., BARTSCH, H. Generation of reactive oxygen species by the faecal matrix. *European Journal of Cancer*, v 46, p.225-232, 2000.

ORSI, R.O.; SFORCIN, J.M.; FUNARI, S.R.C.; BANKOVA, V. Effects of Brazilian and Bulgarian propolis on bactericidal activity of macrophages against *Salmonella Typhimurium*. *International Immunopharmacology*, v. 5, p.359-368, 2005.

ONO, K.; NAKANE, H. Mecanismos of inhibition of various cellular DNA and RNA polymerases by several flavonoids. *Journal of Biochemistry*, v.108, p. 609-613, 1990.

PANDEY, R.C. Prospecting for potentially new pharmaceuticals from natural sources. *Medicinal research reviews*, v.18, p. 333-346, 1998.

PARK, Y. K. Evaluation of brazilian propolis by both physicochemical methods and biological activity. *Honeybe Science*, Tamagawa, v.21, n.2, p.85-90, 2000.

PARK, Y.K.; PAREDES-GUZMAN, J.F.; AGUIAR, C.L.; ALENCAR, S.M.; FUJIWARA, F.Y. Chemical constituents in *Baccharis dracunculifolia* as the main botanical origin of southeastern Brazilian Propolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Washington, v.52, n.5, p. 1100-1103, 2004.

PARK, Y.K.; ALENCAR, S.M.; AGUIAR, C.L. Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, v.50, p.2502-2506, 2002^a.

PARK, Y.K.; ALENCAR, S.M.; SCAMPARINI, A.R.P.; AGUIAR, C.L. Propolis produzida no sul do Brasil, Argentina e Uruguai: evidencias fitoquimicas de sua origem vegetal. *Ciência Rural, Santa Maria* v.32, 997-1003, 2002b.

PEREIRA, A.D.; ANDRADE, S.F.; SWERTS, M.S.O.; MAISTRO, E.L. First in vivo evaluation of the mutagenic effect of Brazilian green propolis by comet assay and micronucleus test. *Food and Chemical Toxicology*, v.46, p.2580-2584, 2008.

PEREIRA, A.S., NASCIMENTO, A.A., AQUINO NETO, F.R. Lupeol alkanates in Brazilian propolis. *Zeitschrift fur Naturforschung*, v.57, p.721-726, 2002a.

PEREIRA, A.S.; SEIXAS, F.R.M.S.; AQUINO NETO, F.R. Própolis: 100 anos de pesquisas e suas perspectivas futuras. *Química Nova*, v.25, p.321-326, 2002b.

PICADA, J.N.; FLORES, D.G.; ZETTLER, C.G.; MARRONI, N.P.; ROESLER, R.; HENRIQUES, J.A. DNA damage in brain cells of mice treated with an oxidized form of apomorphine. *Brain Research Molecular Brain Research*, v.114, p.80-85, 2003 .

RESENDE, F.A.; ALVES, J.M.; MUNARI, C.C.; SENEDESE, J.M.; SOUSA, J.P.; BASTOS, J.K.; TAVARES, D.C. Inhibition of doxorubicin-induced mutagenicity by *Baccharis dracunculifolia*. *Mutation Research*, v.634, p.112-118, 2007.

RIBEIRO, L.R.; SALVADORI, D.M.F.; MARQUES, E.K. (Org). Mutagênese Ambiental. Canoas, Editora da Ulbra, 2003, 355p.

RIZZO, E.; VARSAVKY, M.; HAIDUKOWSKI, M.; FRADE, H. Macrocyclic Trichothecenes in *Baccharis coridifolia* Plants And Endophytes And *Baccharis a rtemisioides* Plants. *Toxicon*, n. 5, v.35, p.753-757, 1997.

ROSA, R.M.; SULZBACHER, K.; PICADA, J.N.; ROESLER, R.; SAFFI, J.; BRENDEL, M.; HENRIQUES, J.A.P. Genotoxicity of diphenyl diselenide in bacteria and yeast. *Mutation Research*, v.563, p.107-115, 2004.

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.

ROZZA, D.B.; RAYMUNDO, D.L.; CORRÊA, A.M.R.; SEITZ, A.L.; DRIEMEIER D. & COLODEL, E.M. Spontaneous *Baccharis coridifolia* (Compositae) poisoning in sheep. *Pesquisa Veterinaria Brasileira*, n.26, v.1, p.21-25, 2006.

SAHU, S.C. & GRAY, G.C. Pro-oxidant activity of flavonoids: effects on glutathione and glutathione S-transferase in isolated rat liver nuclei. *Cancer Letters*, v.104, p.193-196, 1996.

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.

SHARP, H.; BARTHOLOMEW, B.; BRIGHT, C.; LATIF, Z.; SARKER, S.D.; NASH, R.J. 6-Oxygenated flavones from *Baccharis trinervis* (Asteraceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, v.29, p.105-107, 2001.

SHU, Y.Z. Recent natural products based drug development: A pharmaceutical industry perspective. *Journal of Natural Products*, v.61: p.1053-1071, 1998.

SILVA, F.G.; JANUÁRIO, A.H.; PINTO, J.E.B.P.; NASCIMENTO, V.E.; BARIZAN, W.S.; SALES, J.F.; FRANÇA, S.C. Teor de flavonóides em populações silvestre e cultivada de carqueja [*Baccharis trimera* (Less.) DC.] coletadas nas estações seca e úmida. *Revista Brasileira Planta Mededica*, n.2, v.8, p.19-25, 2006.

SILVA LEITÃO, D.P.; FILHO, A.A.S.; POLIZELLO, A.C.M.; BASTOS, S.K.; SPADARO, A.C.C. Comparative Evaluation of *in-Vitro* Effects of Brazilian Green Própolis and *Baccharis dracunculifolia* Extracts on Cariogenic Factors of *Streptococcus mutans*. *Biology Pharmacology Bull*, v.27, p. 1834-1839, 2004.

SIMÕES, C.M.O.; MENTZ, L.A.; SCHENKEL, E.P.; IRGANG, B.E.; STEHMANN, J.R. Plantas da medicina popular no Rio Grande do Sul. Porto Alegre, Editora da Universidade -UFRGS, 1986,174p.

SIMÕES, C.M.O.; MENTZ, L.A.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; PETROVICK, P.R. Plantas da medicina popular no Rio Grande do Sul. Porto Alegre, Editora da Universidade -UFRGS, 1989,174p.

SIMÕES, C.M.O.; MENTZ, L.A.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; PETROVICK, P.R. Farmacognosia: da Plantas ao medicamento . Porto Alegre, Editora da Universidade –UFRGS-UFSC, 1999,87p.

SIMÕES, C.M.O.; MENTZ, L.A.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; PETROVICK, P.R. Farmacognosia: da Plantas ao medicamento In: SIMÕES, C.M.O.; SPITZER, V.(Eds.) Óleos Voláteis, Porto Alegre: Editora da Universidade –UFRGS-UFSC, P.467-495, 2003.

SINGH, N.P.; McCOY, M.T.; TICE, R.R.; SCHEIDER, E.L. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, v.175, p.184-191, 1988.

SOICKE, H.; PESCHLOW, E.L. Characterisation of flavonoids from *Baccharis trimera* and antihepatotoxic properties. *Planta Medica*, v.53, p.37-9, 1987.

SOULÉ, M.E. Conservation: tactics for a constant crisis. *Science*, v.253, p.744-750, 1991.

STOPPER, H.; ECKERT, I.; WAGENER, P.; SCHULZ, W.A. Formation of micronuclei and inhibition of topoisomerase II in the comet assay in mammalian cells with altered DNA methylation. *Recent Results Cancer Research*, v.143, p.183–193, 1997.

TEIXEIRA, E.W.; NEGRI, G.; MEIRA, R.M.S.S.; MESSAGE, D.; SALATINO, A. Plant origin of green propolis: bee behavior, plant anatomy and chemistry. *Advance Access Publication*, n.1, v.2, p.85-92, 2005.

TICE, R.R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, Y. Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. *Environmental Molecular Mutagenesis*, v. 35, p. 206-221, 2000.

TORRES, L.M.B.; GAMBERINI, M.T.; ROQUE, N.F.; LIMA-LANDMAN, M.T.; SOUCCAR, C.; LAPA, A.J. Diterpene from *Baccharis trimera* with a relaxant effect on rat vascular smooth muscle. *Phytochemistry*, v.55, p.617±619, 2000.

VARASCHIN, M.S.; BARROSO, C.S.L.; BRUCE B. J. Intoxicação experimental por *Baccharis coridifolia* (Compositae) em bovinos. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.18, p.69-74, 1998.

VERDI, L.G.; BRIGHENTE, I.M.C.; PIZZOLATTI, M.G. Gênero *Baccharis* (ASTERACEAE): Aspectos Químicos, Econômicos e Biológicos. *Química Nova*, n.1, v. 28, p.85-94, 2005.

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.

VOZIYAN, P.A.; HAUG, J.S.; MELNYKOVYCH, G. Mechanism of Farnesol Cytotoxicity: Further Evidence for the Role of PKC-Dependent Signal Transduction in Farnesol-Induced Apoptotic Cell Death. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, San Diego, v.212, p. 479-486, 1995.

YAMAGUCHI, T.; TAKAMURA, H.; MATOBA, T.; TERAOKA, J. HPLC method for evaluation of the free radical-scavenging activity of foods by using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl. *Biosciences, Biotechnology and Biochemistry*, v.62, p.1201-1204, 1998.

ZDERO, C.; BOHLMANN, F.; NIEMEYER, H.M. An Unusual Dimeric Sesquiterpene And Other Constituents From Chilean *Baccharis* Species, *Phytochemistry*, v. 30, n. 5, p.1597-1601, 1991.

WIKLUND, S.J.; AGURELL, E. Aspects of design and statistical analysis in the Comet assay. *Mutagenesis*, v.18, p.167-175, 2003.

Sistemas de Legislação em Vigilância Sanitária; Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>> acesso em: 10/05/2007.

Disponível em: <<http://plantamatriz.com.br/jpg/propolis.jpg>>acesso em: 08/06/2008.

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](#)