



ANA PAULA SIQUEIRA DE OLIVEIRA

**Mutagenicidade e estrogenicidade de plantas da família Eriocaulaceae e
relação estrutura-atividade de algumas substâncias isoladas**

Araraquara – SP

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.



ANA PAULA SIQUEIRA DE OLIVEIRA

**Mutagenicidade e estrogénicidade de plantas da família Eriocaulaceae e
relação estrutura-atividade de algumas substâncias isoladas**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia (Área de Concentração em Microbiologia), da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: *Prof^a Dr^a Eliana Aparecida Varanda*

Araraquara – 2010

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

O48m Oliveira, Ana Paula Siqueira de
Mutagenicidade e estrogenicidade de plantas da família Eriocaulaceae e
relação estrutura-atividade de algumas substâncias isoladas. / Ana Paula
Siqueira de Oliveira. – Araraquara, 2010.
201 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio
de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação
em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia
Orientador: Eliana Aparecida Varanda

1. Teste de Ames. 2. Teste RYA. 3. Eriocaulaceae . 4. Flavonóides. I.
Varanda, Eliana Aparecida, orient. II. Título.

CAPES: 40300005

Apresentação

Esse trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Mutagênese do Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista (UNESP)
- Campus de Araraquara

Dedicatória

Dedico este trabalho a Deus e ao amor incondicional que Dele vem.

Aos meus criadores e cuidadores nesta vida, meus queridos pais. Sem eles eu nada seria e meus sonhos não seriam nada mais que fantasias. Minhas conquistas são fruto de sua dedicação e apoio. A vocês, todo meu amor!

Ana Paula

*“Ainda que eu falasse
A língua dos homens
E falasse a língua dos anjos
Sem amor, eu nada seria...”*

Renato Russo (recortes do Apóstolo Paulo e de Camões)

Agradecimientos

Agradeço a Prof^a Dr^a Eliana Aparecida Varanda pela primorosa orientação, amizade, solidariedade, dedicação. Obrigada por se mostrar sempre disponível mesmo nos momentos mais atribulados. Obrigada pela bela formação que me proporcionou, tanto na vida acadêmica quanto na pessoal!

Ao Prof^o Dr^o Marcelo Aparecido da Silva pela maravilhosa contribuição neste trabalho, pela prontidão das informações e amostras, por ter aceitado imediatamente o convite para compor as bancas do Exame Geral de Qualificação e de Defesa do Mestrado. Foi uma enorme satisfação trabalharmos em parceria. Espero que muitas ainda venham!

Ao Prof^o Dr^o Luís Vitor Sacramento da Silva e à Prof^a Dr^a Denise Crispim Tavares por muito terem contribuído para a significativa melhora da qualidade deste trabalho, quando aceitaram compor as bancas do Exame Geral de Qualificação e Defesa.

Aos colegas de laboratório, os mais antigos, Soraya Varella, Fábio dos Santos e Mariana Frigieri. Nunca esquecerei a boa amizade, as boas conversas, as dúvidas tiradas. Aos mais recentes, Flávia, Mariana, Aline, Juliana e Vanessas, obrigada pela amizade e pela paciência dedicada.

Às técnicas do laboratório de Microbiologia, Néia, Marisa e especialmente à Sílvia, pela grande ajuda no dia-a-dia, pelos ensinamentos e pelas conversas nos momentos felizes e difíceis.

Às funcionárias da pós-graduação, Cláudia, Sônia, Laura e Ângela, pela ajuda, dedicação, e por sempre me receberem com simpatia.

Aos amigos da pós-graduação, Helen (Berê), Tatiana (Tháty), Isabel (Belzinha), Marcelo (Marcelito), Ademir (Juninho), Jacqueline (Jacque) pela amizade despretensiosa, pelo bom humor e risadas constantes, pelo acolhimento nos momentos difíceis, pelos belos ensinamentos, por mostrar realidades diferentes e por compartilhar momentos maravilhosos comigo!

Às amigas de longe, mas que estão sempre comigo, mesmo na distância, Mariana, Priscila e Amanda. Vocês são meus melhores pedaços, são pra quem eu corro quando tudo é feliz ou triste. Não importa a circunstância, vocês serão sempre irmãs!

Aos meus familiares, especialmente meus queridos irmãos, Karol e André, por entenderem que nem sempre é possível estar perto e compartilhar dos seus melhores e piores momentos.

À Capes (Coordenação de Aperfeiçoamento da Pesquisa) pela concessão da bolsa de estudo.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas pelo acolhimento e incentivo à vida acadêmica.

A todos aqueles que não foram citados e, de alguma maneira, contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito Obrigada!

*“Há duas formas de viver sua vida:
Uma é acreditar que não existe milagre.
E a outra é acreditar que todas as coisas são um milagre”*

Albert Einstein

Sumário

Capítulo I

Resumo

Abstract

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

1. Revisão da literatura	32
1. 1. Cadeia do Espinhaço e a Serra do Cipó	33
1. 2. Eriocaulaceae	34
1. 3. Eriocaulon	37
1. 4. Leiothrix	39
1. 5. Importância dos estudos com plantas	41
1. 6. Atividade estrogênica	43
1. 7. Atividade mutagênica	45
1. 8. Relação estrutura-atividade	46
2. Objetivos	47
2. 1. Objetivo Geral	48
2. 2. Objetivos específicos	48
3. Materiais e métodos	50
3. 1. Obtenção do material vegetal	51
3. 1. 1. <i>Eriocaulon ligulatum</i>	54
3. 1. 2. <i>Leiothrix flavescens</i>	54

3. 1. 3. <i>Leiothrix spiralis</i>	55
3. 1. 4. Obtenção de isocumarinas de outras plantas da família Eriocaulaceae	55
3. 1. 4. 1. Obtenção da paepalantina de <i>Paepalanthus vellozioides</i> e <i>P. bromelioides</i>	55
3. 1. 4. 2. Obtenção do dímero 8-8' da paepalantina e das paepalantinas mono e diglicosiladas de <i>Paepalanthus bromelioides</i>	56
3. 1. 4. 3. Obtenção da planifolina de <i>Paepalanthus planifolius</i>	56
3. 2. Obtenção das paepalantinas acetiladas	56
3. 3. Teste RYA (Recombinant Yeast Assay)	56
3. 3. 1. Linhagem e plasmídeos utilizados	56
3. 3. 2. Soluções e meios utilizados	57
3. 3. 3. Inóculos de <i>Sacharomyces cerevisiae</i>	57
3. 3. 4. Controles	57
3. 3. 5. Avaliação da atividade estrogênica	58
3. 3. 6. Análise estatística	59
3. 4. Teste de Ames	60
3. 4. 1. Linhagens utilizadas	60
3. 4. 2. Manutenção e estoque das cepas de <i>Salmonella typhimurium</i>	60
3. 4. 3. Verificação das características genéticas das cepas de <i>S. typhimurium</i>	60
3. 4. 4. Preparo dos inóculos de <i>S. typhimurium</i> utilizados no ensaio	61
3. 4. 5. Meios de cultura	61
3. 4. 6. Controles	62
3. 4. 7. Preparo da mistura S9	62
3. 4. 8. Realização dos ensaios de mutagenicidade	62
3. 4. 9. Forma de análise dos resultados	63

3. 5. Avaliação da relação estrutura-atividades estrogênica e mutagênica das substâncias isoladas de plantas da família Eriocaulaceae	64
4. Resultados	66
4. 1. Teste RYA	67
4. 1. 1. Teste RYA com extratos, frações enriquecidas e substâncias isoladas de <i>Eriocaulon ligulatum</i>	67
4. 1. 2. Teste RYA com extratos, frações enriquecidas e substâncias isoladas de <i>Leiothrix flavescens</i>	82
4. 1. 3. Teste RYA com extratos de <i>Leiothrix spiralis</i>	97
4. 1. 4. Teste RYA com as isocumarinas isoladas de outras plantas da família Eriocaulaceae	100
4. 1. 4. 1. Teste RYA com a paepalantina isolada de <i>Paepalanthus vellozioides</i> e <i>P. bromelioides</i>	100
4. 1. 4. 2. Teste RYA com o dímero 8-8' da paepalantina e com as paepalantinas mono e diglicosiladas isoladas de <i>Paepalanthus bromelioides</i>	102
4. 1. 4. 3. Teste RYA com a planifolina isolada de <i>Paepalanthus planifolius</i>	106
4. 1. 4. 4. Teste RYA com as paepalantinas acetiladas	108
4. 2. Teste de Ames	113
4. 2. 1. Teste de Ames com extratos, frações enriquecidas e substâncias isoladas de <i>Eriocaulon ligulatum</i>	113
4. 2. 2. Teste de Ames com extratos de <i>Leiothrix flavescens</i>	124
4. 2. 3. Teste de Ames com extratos de <i>Leiothrix spiralis</i>	126
4. 3. Avaliação da relação estrutura-atividade estrogênica e mutagênica das substâncias isoladas de plantas da família Eriocaulaceae	129
4. 3. 1. Avaliação da relação estrutura-atividade estrogênica	129

4. 3. 2. Avaliação da relação estrutura-atividade mutagênica	130
4. 3. 2. 1. Flavonóides	130
4. 3. 2. 2. Isocumarinas	131
5. Discussão	134
6. Conclusões	155
7. Referências Bibliográficas	160

CAPÍTULO II

Mutagenicity and structure-activity relationship of compounds isolated from <i>Eriocaulon ligulatum</i> (Eriocaulaceae) measured by <i>Salmonella/microsome</i> assay	175
Anexo I	203

Resumo

A família Eriocaulaceae possui cerca de 1200 espécies divididas em 10 gêneros e suas espécies de plantas são conhecidas como sempre-vivas, por sua grande durabilidade e coloração paleácea. Neste trabalho foram estudadas as espécies: *Eriocaulon ligulatum*, *Leiothrix flavescens* e *Leiothrix spiralis*, as quais foram avaliadas quanto à mutagenicidade e estrogenicidade e algumas substâncias isoladas foram utilizadas para um estudo de relação estrutura-atividade mutagênica e estrogênica. Para avaliação da mutagenicidade, utilizou-se o teste de Ames, e o teste RYA (Recombinant Yeast Assay) foi o empregado para avaliação da estrogenicidade. Os resultados da atividade mutagênica demonstraram que apenas *E. ligulatum* foi considerado mutagênico e isso foi atribuído às isocumarinas e flavonóides agliconas. Os estudos de relação estrutura-atividade mutagênica mostraram que esta ação foi devida à presença de hidroxilas em posições estratégicas e à ausência de glicosilações, metoxilações, ou qualquer outro tipo de substituição. Para complementar os estudos de relação estrutura-atividade mutagênica com as isocumarinas, utilizou-se resultados já publicados de mutagenicidade de moléculas semelhantes à isocumarina eriocaulina, isolada de *E. ligulatum*. Verificou-se que os dímeros de isocumarinas têm a sua mutagenicidade influenciada pela conformação espacial, pela presença de grupos hidroxilas mais afastados de grupos volumosos, e pelo tipo de ligação que une os seus monômeros. Quando o potencial estrogênico foi avaliado, apenas a *L. flavescens* apresentou resultados positivos e que esses são devidos à presença de flavonas agliconas, como a luteolina e a metoxiluteolina. As mesmas isocumarinas, pertencentes a outras espécies da família Eriocaulaceae, avaliadas no teste de Ames, foram avaliadas no teste RYA. E seus resultados foram cruciais para o estabelecimento da relação estrutura-atividade estrogênica para as isocumarinas. Verificou-se que as isocumarinas têm a estrogenicidade favorecida pela presença de adições de açúcares e por

acetilações e que existe variação desta em relação à posição em que essas substituições ocorrem. Verificou-se também que os flavonóides interagiram melhor com o receptor de estrógenos do que as isocumarinas, pois apresentaram os resultados mais expressivos. Portanto, já que as flavonas, isoladas de *L. flavescens*, não foram consideradas mutagênicas pelo teste de Ames e foram positivas para o teste RYA, elas são os melhores candidatos para medicamentos alternativos à reposição hormonal utilizada atualmente.

Palavras-chave: Teste de Ames, Teste RYA, Eriocaulaceae, *Eriocaulon*, *Leiothrix*, Isocumarinas, Flavonóides.

Abstract

Eriocaulaceae family comprises around 1200 species, divided into 10 genera, and their plant species are known as “sempre-vivas” (everlasting flowers) for its durability and color. In this work the species *Eriocaulon ligulatum*, *Leiothrix flavescens* and *Leiothrix spiralis* were studied. These species were evaluated for the mutagenic and the estrogenic potential and some of their isolated compounds were used for a study of structure-mutagenic and estrogenic activities. To assess mutagenicity we used Ames test and the Recombinant Yeast Assay (RYA test) was used for evaluation of estrogenicity. The results of mutagenic activity showed that only *E. ligulatum* presented mutagenicity and that these results were due to its naphthopyranones and flavonoid aglicons. The structure-mutagenic activity studies shown that this action were due to the presence of hydroxyl groups in strategic positions and no glycosylations, methoxylation or any type of substitutions. To complement the studies of structure-mutagenic activity with the naphthopyranones, we use results already published of the mutagenicity of similar compounds to the naphthopyranone ericaulina, isolated from *E. ligulatum*, and compare them with the data from ericauline. It was found that the dimers of naphthopyranones have their mutagenicity influenced by its spatial conformation, for the presence of hydroxyl groups furthest away from large groups, and the type of connection that join their monomers. When the estrogenic potential was assessed, we found that only *L. flavescens* showed positive results and that these results are due to the presence of flavones in the form of aglycones, such as luteolin and methoxyluteolin. The same naphthopyranones belonging to other species of Eriocaulaceae family, evaluated in the Ames test, were assessed in the RYA test. Their results were crucial for the establishment of structure-estrogenic activity for naphthopyranones. It was found that the naphthopyranones have their estrogenicity favored by additions of sugars and acetylations and that varies with the

position that these substitutions occur. It was also noticed that flavonoids interact better with the estrogen receptor than naphthopyranones. Therefore, as the flavones, isolated from *L. flavescens* did not show positive results in the Ames test, and were not considered mutagenic and were positive for the RYA test, they are the best candidates for alternative medicines for hormone replacement therapy that is used today.

Keywords: Ames test, RYA test, Eriocaulaceae, *Eriocaulon*, *Leiothrix*, Naphthopyranones, Flavonoids.

Lista de Figuras

<i>Figura</i>	<i>Descrição</i>	<i>Página</i>
1.	Mapa do Estado de Minas Gerais em que se destaca a porção da Cadeia do Espinhaço compreendida entre Belo Horizonte e o Estado da Bahia (Menezes & Giulietti, 1986).	33
2.	Ambiente de desenvolvimento das Eriocaulaceae.	34
3.	Foto de sempre-vivas tingidas para vendas.	35
4.	Confecção artesanal de objetos usando as “sempre-vivas” como matéria-prima.	36
5.	Foto de <i>Eriocaulon ligulatum</i> (identificada pelo Prof. Dr. Paulo Takeo Sano –IB - USP). <i>Voucher</i> SANO 2973.	39
6.	Excicata e Capítulo de <i>Leiothrix flavescens</i> .	40
7.	Foto de <i>Leiothrix spiralis</i> (Eriocaulaceae).	40
8.	Estrutura química dos isoflavonóides da soja.	44
9.	Atividade estrogênica expressa em Estradiol Equivalentes (EEq) para diferentes concentrações testadas do extrato metanólico de <i>E. ligulatum</i> (E.I. MeOH) , além dos controles de toxicidade, negativo e positivo, na linhagem geneticamente modificada BY4741 de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	69
10.	Atividade estrogênica expressa em Estradiol Equivalentes (EEq) para diferentes concentrações testadas do extrato diclorometânico de <i>E. ligulatum</i> (E. I. CH₂Cl₂) , além dos controles de toxicidade, negativo e positivo, na linhagem geneticamente modificada BY4741 de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	70
11.	Atividade estrogênica expressa em Estradiol Equivalentes (EEq) para diferentes concentrações testadas da Fração de Flavonóides Glicosilados (FG) do extrato metanólico de <i>Eriocaulon ligulatum</i> , além dos controles de toxicidade, negativo e positivo, na linhagem geneticamente modificada BY4741 de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	72

12.	Média das unidades de fluorescência \pm desvio padrão obtidos para diferentes concentrações testadas da Fração de Flavonóides Glicosilados + Isocumarinas (FGI) do extrato metanólico de <i>Eriocaulon ligulatum</i> , além dos controles de toxicidade, negativo e positivo, na linhagem geneticamente modificada BY4741 de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	73
13.	Média das unidades de fluorescência \pm desvio padrão obtidos para diferentes concentrações testadas da Fração de Flavonóides Agliconas + Isocumarinas (FAI) do extrato metanólico de <i>Eriocaulon ligulatum</i> , além dos controles de toxicidade, negativo e positivo, na linhagem geneticamente modificada BY4741 de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	74
14.	Atividade estrogênica expressa em Estradiol Equivalentes (EEq) para diferentes concentrações testadas da Fração Restante (FR) do extrato metanólico de <i>Eriocaulon ligulatum</i> , além dos controles de toxicidade, negativo e positivo, na linhagem geneticamente modificada BY4741 de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	75
15.	Atividade estrogênica expressa em Estradiol Equivalentes (EEq) para diferentes concentrações testadas da substância isolada 6-metoxiapigenina-7-O-β-D-glucopiranosídeo (E.I. 1) do extrato metanólico de <i>Eriocaulon ligulatum</i> , além dos controles de toxicidade, negativo e positivo, na linhagem geneticamente modificada BY4741 de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	77
16.	Atividade estrogênica expressa em Estradiol Equivalentes (EEq) para diferentes concentrações testadas da substância isolada 6-metoxiapigenina-7-O-β-D-alopiranosídeo (E.I. 2) do extrato metanólico de <i>Eriocaulon ligulatum</i> , além dos controles de toxicidade, negativo e positivo, na linhagem geneticamente modificada BY4741 de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	78
17.	Atividade estrogênica expressa em Estradiol Equivalentes (EEq) para diferentes concentrações testadas da substância isolada 6,4'-dimetoxiquercetina-3-O-β-D-6''[(E)-3,4,5-tri-hidroxi-cinnamoil] glucopiranosídeo (E.I. 3) do extrato metanólico de <i>Eriocaulon ligulatum</i> , além dos controles de toxicidade, negativo e positivo, na linhagem geneticamente modificada BY4741 de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	79
18.	Atividade estrogênica expressa em Estradiol Equivalentes (EEq) para diferentes concentrações testadas da substância isolada 6-metoxiapigenina (E.I. 4) do extrato metanólico de <i>Eriocaulon ligulatum</i> , além dos controles de toxicidade, negativo e positivo, na linhagem geneticamente modificada BY4741 de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	80
19.	Atividade estrogênica expressa em Estradiol Equivalentes (EEq) para diferentes concentrações testadas da substância isolada Eriocaulina (E.I. 5) do extrato diclorometânico de <i>Eriocaulon ligulatum</i> , além dos controles de toxicidade, negativo e positivo, na linhagem geneticamente modificada BY4741 de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	81

20.	Atividade estrogênica expressa em Estradiol Equivalentes (EEq) para diferentes concentrações testadas extrato metanólico de <i>Leiothrix flavescens</i> (L. f. MeOH) , além dos controles de toxicidade, negativo e positivo, na linhagem geneticamente modificada BY4741 de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	83
21.	Atividade estrogênica expressa em Estradiol Equivalentes (EEq) para diferentes concentrações testadas do extrato diclorometânico de <i>Leiothrix flavescens</i> (L. f. CH₂Cl₂) , além dos controles de toxicidade, negativo e positivo, na linhagem geneticamente modificada BY4741 de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	84
22.	Atividade estrogênica expressa em Estradiol Equivalentes (EEq) para diferentes concentrações testadas da Fração 1 L. f. do extrato metanólico de <i>Leiothrix flavescens</i> , além dos controles de toxicidade, negativo e positivo, na linhagem geneticamente modificada BY4741 de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	87
23.	Atividade estrogênica expressa em Estradiol Equivalentes (EEq) para diferentes concentrações testadas da Fração de Xantonas (Fração 2 Lf) do extrato metanólico de <i>Leiothrix flavescens</i> , além dos controles de toxicidade, negativo e positivo, na linhagem geneticamente modificada BY4741 de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	88
24.	Atividade estrogênica expressa em Estradiol Equivalentes (EEq) para diferentes concentrações testadas da Fração de Xantonas Puras (Fração 3 Lf) do extrato metanólico de <i>Leiothrix flavescens</i> , além dos controles de toxicidade, negativo e positivo, na linhagem geneticamente modificada BY4741 de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	89
25.	Atividade estrogênica expressa em Estradiol Equivalentes (EEq) para diferentes concentrações testadas da Fração de Flavonóides Glicosilados Puros (Fração 4 Lf) do extrato metanólico de <i>Leiothrix flavescens</i> , além dos controles de toxicidade, negativo e positivo, na linhagem geneticamente modificada BY4741 de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	90
26.	Atividade estrogênica expressa em Estradiol Equivalentes (EEq) para diferentes concentrações testadas da Fração de Flavonóides Agliconas (Fração 5 Lf) do extrato metanólico de <i>Leiothrix flavescens</i> , além dos controles de toxicidade, negativo e positivo, na linhagem geneticamente modificada BY4741 de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	91
27.	Atividade estrogênica expressa em Estradiol Equivalentes (EEq) para diferentes concentrações testadas da substância isolada luteolina (L.f. 1) do extrato metanólico de <i>Leiothrix flavescens</i> , além dos controles de toxicidade, negativo e positivo, na linhagem geneticamente modificada BY4741 de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	94
28.	Atividade estrogênica expressa em Estradiol Equivalentes (EEq) para diferentes concentrações testadas da substância isolada 6-metoxiluteolina (L.f. 2) do extrato metanólico de <i>Leiothrix flavescens</i> , além dos controles de toxicidade, negativo e positivo, na linhagem geneticamente modificada BY4741 de	95

	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	
29.	Atividade estrogênica expressa em Estradiol Equivalentes (EEq) para diferentes concentrações testadas da substância isolada 1,3-O-diferuloilglicerol (L.f. 3) do extrato metanólico de <i>Leiothrix flavescens</i> , além dos controles de toxicidade, negativo e positivo, na linhagem geneticamente modificada BY4741 de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	96
30.	Atividade estrogênica expressa em Estradiol Equivalentes (EEq) para diferentes concentrações testadas do extrato metanólico de <i>Leiothrix spiralis</i> (L. s. MeOH) , além dos controles de toxicidade, negativo e positivo, na linhagem geneticamente modificada BY4741 de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	98
31.	Atividade estrogênica expressa em Estradiol Equivalentes (EEq) para diferentes concentrações testadas do extrato diclorometânico de <i>Leiothrix spiralis</i> (L. s. CH₂Cl₂) , além dos controles de toxicidade, negativo e positivo, na linhagem geneticamente modificada BY4741 de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	99
32.	Atividade estrogênica expressa em Estradiol Equivalentes (EEq) para diferentes concentrações testadas da isocumarina paepalantina isolada do extrato metanólico de <i>Paepalanthus vellozioides</i> , além dos controles de toxicidade, negativo e positivo, na linhagem geneticamente modificada BY4741 de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	101
33.	Atividade estrogênica expressa em Estradiol Equivalentes (EEq) para diferentes concentrações testadas do dímero 8-8' da isocumarina paepalantina isolado do extrato metanólico de <i>Paepalanthus bromelioides</i> , além dos controles de toxicidade, negativo e positivo, na linhagem geneticamente modificada BY4741 de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	103
34.	Atividade estrogênica expressa em Estradiol Equivalentes (EEq) para diferentes concentrações testadas da isocumarina paepalantina monoheterosídica isolada do extrato metanólico de <i>Paepalanthus bromelioides</i> , além dos controles de toxicidade, negativo e positivo, na linhagem geneticamente modificada BY4741 de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	104
35.	Atividade estrogênica expressa em Estradiol Equivalentes (EEq) para diferentes concentrações testadas da isocumarina paepalantina diheterosídica isolada do extrato metanólico de <i>Paepalanthus bromelioides</i> , além dos controles de toxicidade, negativo e positivo, na linhagem geneticamente modificada BY4741 de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	105
36.	Atividade estrogênica expressa em Estradiol Equivalentes (EEq) para diferentes concentrações testadas da isocumarina planifolina isolada do extrato metanólico de <i>Paepalanthus planifolius</i> , além dos controles de toxicidade, negativo e positivo, na linhagem geneticamente modificada BY4741 de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	107
37.	Atividade estrogênica expressa em Estradiol Equivalentes (EEq) para diferentes concentrações testadas da isocumarina paepalantina acetilada na posição 5 (paepalantina 5-acetilada), além dos controles de toxicidade, negativo e positivo, na	110

	linhagem geneticamente modificada BY4741 de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	
38.	Atividade estrogênica expressa em Estradiol Equivalentes (EEq) para diferentes concentrações testadas da isocumarina paepalantina acetilada na posição 6 (paepalantina 6-acetilada), além dos controles de toxicidade, negativo e positivo, na linhagem geneticamente modificada BY4741 de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	111
39.	Atividade estrogênica expressa em Estradiol Equivalentes (EEq) para diferentes concentrações testadas da isocumarina paepalantina acetilada na posição 7 (paepalantina 7-acetilada), além dos controles de toxicidade, negativo e positivo, na linhagem geneticamente modificada BY4741 de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	112
40.	A) Estrutura do estradiol; Exemplos de fitoestrógenos isolados da soja: B) Daidzeína; C) Genisteína; D) Gliciteína; Comparação dos fitoestrógenos da soja com a estrutura do estradiol: E) Daidzeína e F) Genisteína.	137
41.	Comparação entre as hidroxilas das moléculas do estradiol e de luteolina.	140
42.	Estrutura básica dos flavonóides.	146
43.	Estrutura básica das isocumarinas.	149
44.	Estruturas dos dímeros da paepalantina em 3D	152

Lista de Tabelas

Tabela	Descrição	Página
1.	Quantidade obtida de extratos e seus rendimentos das espécies estudadas.	51
2.	Estruturas químicas das substâncias isoladas de diferentes espécies de plantas da família Eriocaulaceae, avaliadas quanto a sua estrogenicidade, mutagenicidade e relação estrutura-atividade.	52
3.	Atividade estrogênica expressa através da média das unidades de fluorescência \pm desvio padrão e equilaventes de estradiol (EEq) para diferentes concentrações testadas do extrato metanólico de <i>E. ligulatum</i> (E.I. MeOH), além dos controles de toxicidade, negativo e positivo, na linhagem geneticamente modificada BY4741 de <i>S. cerevisiae</i> .	69
4.	Atividade estrogênica expressa através da média das unidades de fluorescência \pm desvio padrão e equilaventes de estradiol (EEq) para diferentes concentrações testadas do extrato diclorometânico de <i>E. ligulatum</i> (E.I. CH₂Cl₂), além dos controles de toxicidade, negativo e positivo, na linhagem geneticamente modificada BY4741 de <i>S. cerevisiae</i> .	70
5.	Atividade estrogênica expressa através da média das unidades de fluorescência \pm desvio padrão e equilaventes de estradiol (EEq) para diferentes concentrações testadas da Fração de Flavonóides Glicosilados (FG) do extrato metanólico de <i>E. ligulatum</i> , além dos controles de toxicidade, negativo e positivo, na linhagem geneticamente modificada BY4741 de <i>S. cerevisiae</i> .	72
6.	Atividade estrogênica expressa através da média das unidades de fluorescência \pm desvio padrão e equilaventes de estradiol (EEq) para diferentes concentrações testadas da Fração de Flavonóides Glicosilados + Isocumarinas (FGI) do extrato metanólico de <i>E. ligulatum</i> , além dos controles de toxicidade, negativo e positivo, na linhagem geneticamente modificada BY4741 de <i>S. cerevisiae</i> .	73
7.	Atividade estrogênica expressa através da média das unidades de fluorescência \pm desvio padrão e equilaventes de estradiol (EEq) para diferentes concentrações testadas da Fração de Flavonóides Agliconas + Isocumarinas (FAI) do extrato metanólico de <i>E. ligulatum</i> , além dos controles de toxicidade, negativo e positivo, na linhagem geneticamente modificada BY4741 de <i>S. cerevisiae</i> .	74
8.	Atividade estrogênica expressa através da média das unidades de fluorescência \pm desvio padrão e equilaventes de estradiol (EEq) para diferentes concentrações testadas da Fração Restante (FR) do extrato metanólico de <i>E. ligulatum</i> , além dos controles de toxicidade, negativo e positivo, na linhagem geneticamente modificada BY4741 de <i>S. cerevisiae</i> .	75
9.	Atividade estrogênica expressa através da média das unidades de fluorescência \pm desvio padrão e equilaventes de estradiol (EEq)	77

	para diferentes concentrações testadas da substância isolada 6-metoxiapigenina-7-O- β -D-glucopiranosídeo (E.I. 1) do extrato metanólico de <i>E. ligulatum</i> , além dos controles de toxicidade, negativo e positivo, na linhagem geneticamente modificada BY4741 de <i>S. cerevisiae</i>	
10.	Atividade estrogênica expressa através da média das unidades de fluorescência \pm desvio padrão e equilaventes de estradiol (EEq) para diferentes concentrações testadas da substância isolada 6-metoxiapigenina-7-O- β -D-alopiranosídeo (E.I. 2) do extrato metanólico de <i>E. ligulatum</i> , além dos controles de toxicidade, negativo e positivo, na linhagem geneticamente modificada BY4741 de <i>S. cerevisiae</i>	78
11.	Atividade estrogênica expressa através da média das unidades de fluorescência \pm desvio padrão e equilaventes de estradiol (EEq) para diferentes concentrações testadas da substância isolada 6,4'-dimetoxicanferol-3-O- β -D-6"[(<i>E</i>) <i>p</i> -cumaroil] glucopiranosídeo (E.I. 3) do extrato metanólico de <i>E. ligulatum</i> , além dos controles de toxicidade, negativo e positivo, na linhagem geneticamente modificada BY4741 de <i>S. cerevisiae</i> .	79
12.	Atividade estrogênica expressa através da média das unidades de fluorescência \pm desvio padrão e equilaventes de estradiol (EEq) para diferentes concentrações testadas da substância isolada 6-metoxiapigenina (E.I. 4) do extrato metanólico de <i>E. ligulatum</i> , além dos controles de toxicidade, negativo e positivo, na linhagem geneticamente modificada BY4741 de <i>S. cerevisiae</i> .	80
13.	Atividade estrogênica expressa através da média das unidades de fluorescência \pm desvio padrão e equilaventes de estradiol (EEq) para diferentes concentrações testadas da substância isolada Eriocaulina (E.I. 5) do extrato diclorometânico de <i>E. ligulatum</i> , além dos controles de toxicidade, negativo e positivo, na linhagem geneticamente modificada BY4741 de <i>S. cerevisiae</i> .	81
14.	Atividade estrogênica expressa através da média das unidades de fluorescência \pm desvio padrão e equilaventes de estradiol (EEq) para diferentes concentrações testadas do extrato metanólico de <i>L. flavescens</i> (L. f. MeOH), além dos controles de toxicidade, negativo e positivo, na linhagem geneticamente modificada BY4741 de <i>S. cerevisiae</i> .	83
15.	Atividade estrogênica expressa através da média das unidades de fluorescência \pm desvio padrão e equilaventes de estradiol (EEq) para diferentes concentrações testadas do extrato diclorometânico de <i>L. flavescens</i> (L. f. CH₂Cl₂), além dos controles de toxicidade, negativo e positivo, na linhagem geneticamente modificada BY4741 de <i>S. cerevisiae</i> .	84
16.	Atividade estrogênica expressa através da média das unidades de fluorescência \pm desvio padrão e equilaventes de estradiol (EEq) para diferentes concentrações testadas da Fração 1 L.f. do extrato metanólico de <i>L. flavescens</i> , além dos controles de toxicidade, negativo e positivo, na linhagem geneticamente modificada BY4741 de <i>S. cerevisiae</i> .	87

17.	Atividade estrogênica expressa através da média das unidades de fluorescência \pm desvio padrão e equilaventes de estradiol (EEq) para diferentes concentrações testadas da Fração de Xantonas (Fração 2 L.f.) do extrato metanólico de <i>L. flavescens</i> , além dos controles de toxicidade, negativo e positivo, na linhagem geneticamente modificada BY4741 de <i>S. cerevisiae</i> .	88
18.	. Atividade estrogênica expressa através da média das unidades de fluorescência \pm desvio padrão e equilaventes de estradiol (EEq) para diferentes concentrações testadas da Fração de Xantonas Puras (Fração 3 L.f.) do extrato metanólico de <i>L. flavescens</i> , além dos controles de toxicidade, negativo e positivo, na linhagem geneticamente modificada BY4741 de <i>S. cerevisiae</i> .	89
19.	Atividade estrogênica expressa através da média das unidades de fluorescência \pm desvio padrão e equilaventes de estradiol (EEq) para diferentes concentrações testadas da Fração de Flavonóides Glicosilados Puros (Fração 4 L.f.) do extrato metanólico de <i>L. flavescens</i> , além dos controles de toxicidade, negativo e positivo, na linhagem geneticamente modificada BY4741 de <i>S. cerevisiae</i> .	90
20.	Atividade estrogênica expressa através da média das unidades de fluorescência \pm desvio padrão e equilaventes de estradiol (EEq) para diferentes concentrações testadas da Fração de Flavonóides Agliconas (Fração 5 L.f.) do extrato metanólico de <i>L. flavescens</i> , além dos controles de toxicidade, negativo e positivo, na linhagem geneticamente modificada BY4741 de <i>S. cerevisiae</i> .	91
21.	Atividade estrogênica expressa através da média das unidades de fluorescência \pm desvio padrão e equilaventes de estradiol (EEq) para diferentes concentrações testadas da substância isolada luteolina (L.f. 1) do extrato metanólico de <i>L. flavescens</i> , além dos controles de toxicidade, negativo e positivo, na linhagem geneticamente modificada BY4741 de <i>S. cerevisiae</i> .	94
22.	Atividade estrogênica expressa através da média das unidades de fluorescência \pm desvio padrão e equilaventes de estradiol (EEq) para diferentes concentrações testadas da substância isolada 6-metoxiluteolina (L.f. 2) do extrato metanólico de <i>L. flavescens</i> , além dos controles de toxicidade, negativo e positivo, na linhagem geneticamente modificada BY4741 de <i>S. cerevisiae</i> .	95
23.	Atividade estrogênica expressa através da média das unidades de fluorescência \pm desvio padrão e equilaventes de estradiol (EEq) para diferentes concentrações testadas da substância isolada 1,3-O-diferuloilglicerol (L.f. 3) do extrato metanólico de <i>L. flavescens</i> , além dos controles de toxicidade, negativo e positivo, na linhagem geneticamente modificada BY4741 de <i>S. cerevisiae</i> .	96
24.	Atividade estrogênica expressa através da média das unidades de fluorescência \pm desvio padrão e equilaventes de estradiol (EEq) para diferentes concentrações testadas do extrato metanólico de <i>L. spiralis</i> (L.s. MeOH), além dos controles de toxicidade, negativo e positivo, na linhagem geneticamente modificada BY4741 de <i>S. cerevisiae</i> .	98
25.	Atividade estrogênica expressa através da média das unidades de fluorescência \pm desvio padrão e equilaventes de estradiol (EEq)	99

	para diferentes concentrações testadas do extrato diclorometânico de <i>L. spiralis</i> (L.s. CH₂Cl₂), além dos controles de toxicidade, negativo e positivo, na linhagem geneticamente modificada BY4741 de <i>S. cerevisiae</i> .	
26.	Atividade estrogênica expressa através da média das unidades de fluorescência \pm desvio padrão e equilaventes de estradiol (EEq) para diferentes concentrações testadas da isocumarina paepalantina isolada do extrato metanólico de <i>P. vellozoides</i> , além dos controles de toxicidade, negativo e positivo, na linhagem geneticamente modificada BY4741 de <i>S. cerevisiae</i> .	101
27.	Atividade estrogênica expressa através da média das unidades de fluorescência \pm desvio padrão e equilaventes de estradiol (EEq) para diferentes concentrações testadas do dímero 8-8' da isocumarina paepalantina isolado do extrato metanólico de <i>P. bromelioides</i> , além dos controles de toxicidade, negativo e positivo, na linhagem geneticamente modificada BY4741 de <i>S. cerevisiae</i> .	103
28.	Atividade estrogênica expressa através da média das unidades de fluorescência \pm desvio padrão e equilaventes de estradiol (EEq) para diferentes concentrações testadas da isocumarina paepalantina monoheterosídica isolada do extrato metanólico de <i>P. bromelioides</i> , além dos controles de toxicidade, negativo e positivo, na linhagem geneticamente modificada BY4741 de <i>S. cerevisiae</i> .	104
29.	Atividade estrogênica expressa através da média das unidades de fluorescência \pm desvio padrão e equilaventes de estradiol (EEq) para diferentes concentrações testadas da isocumarina paepalantina diheterosídica isolada do extrato metanólico de <i>P. bromelioides</i> , além dos controles de toxicidade, negativo e positivo, na linhagem geneticamente modificada BY4741 de <i>S. cerevisiae</i> .	105
30.	Atividade estrogênica expressa através da média das unidades de fluorescência \pm desvio padrão e equilaventes de estradiol (EEq) para diferentes concentrações testadas da isocumarina planifolina isolada do extrato metanólico de <i>P. planifolius</i> , além dos controles de toxicidade, negativo e positivo, na linhagem geneticamente modificada BY4741 de <i>S. cerevisiae</i> .	107
31.	Atividade estrogênica expressa através da média das unidades de fluorescência \pm desvio padrão e equilaventes de estradiol (EEq) para diferentes concentrações testadas da isocumarina paepalantina acetilada na posição 5 (paepalantina 5-acetilada), além dos controles de toxicidade, negativo e positivo, na linhagem geneticamente modificada BY4741 de <i>S. cerevisiae</i> .	110
32.	Atividade estrogênica expressa através da média das unidades de fluorescência \pm desvio padrão e equilaventes de estradiol (EEq) para diferentes concentrações testadas da isocumarina paepalantina acetilada na posição 6 (paepalantina 6-acetilada), além dos controles de toxicidade, negativo e positivo, na linhagem geneticamente modificada BY4741 de <i>S. cerevisiae</i> .	111

33.	Atividade estrogênica expressa através da média das unidades de fluorescência \pm desvio padrão e equilaventes de estradiol (EEq) para diferentes concentrações testadas da isocumarina paepalantina acetilada na posição 7 (paepalantina 7-acetilada), além dos controles de toxicidade, negativo e positivo, na linhagem geneticamente modificada BY4741 de <i>S. cerevisiae</i> .	112
34.	Atividade mutagênica expressa pelo número médio de revertentes/placa e razão de mutagenicidade (RM) dos extratos: metanólico (E.I. MeOH) e diclorometânico (E.I. CH₂Cl₂) de <i>E. ligulatum</i> em linhagens de <i>S. typhimurium</i> em ausência de metabolização (-S9) e na presença de metabolização (+S9).	114
35.	Atividade mutagênica expressa pelo número médio de revertentes/placa e razão de mutagenicidade (RM) das frações FG e FGI do extrato metanólico de <i>E. ligulatum</i> em linhagens de <i>S. typhimurium</i> em ausência (-S9) e em presença de metabolização (+S9).	117
36.	Atividade mutagênica expressa pelo número médio de revertentes/placa e razão de mutagenicidade (RM) das frações FAI e FR do extrato metanólico de <i>E. ligulatum</i> em linhagens de <i>S. typhimurium</i> em ausência (-S9) e em presença de metabolização (+S9).	118
37.	Atividade mutagênica expressa pelo número médio de revertentes/placa e razão de mutagenicidade (RM) das substâncias isoladas (E.I. 1: 6-metoxiapigenina-7-O-β-D-glucopiranosídeo e E.I. 2: 6-metoxiapigenina-7-O-β-D-alopiranosídeo) da planta <i>E. ligulatum</i> em linhagens de <i>S. typhimurium</i> na ausência (-S9) e na presença de metabolização (+S9).	121
38.	Atividade mutagênica expressa pelo número médio de revertentes/placa e razão de mutagenicidade (RM) das substâncias isoladas (E.I. 3: 6,4'-dimetoxicancerol-3-O-β-D-6"[(<i>E</i>) <i>p</i>-cumaroil] glucopiranosídeo e E.I. 4: 6-metoxiapigenina) da planta <i>E. ligulatum</i> em linhagens de <i>S. typhimurium</i> na ausência (-S9) e na presença de metabolização (+S9).	122
39.	Atividade mutagênica expressa pelo número médio de revertentes/placa e razão de mutagenicidade (RM) das substâncias isolada (E.I. 5: Eriocaulina) da planta <i>E. ligulatum</i> em linhagens de <i>S. typhimurium</i> na ausência (-S9) e na presença de metabolização (+S9).	123
40.	Atividade mutagênica expressa pelo número médio de revertentes/placa e razão de mutagenicidade (RM) dos extratos: metanólico (L.f. MeOH) e diclorometânico (L.f. CH₂Cl₂) de <i>L. flavescens</i> em linhagens de <i>S. typhimurium</i> em ausência de metabolização (-S9) e na presença de metabolização (+S9).	125
41.	Atividade mutagênica expressa pelo número médio de revertentes/placa e razão de mutagenicidade (RM) dos extratos metanólico (L.s. MeOH) e diclorometânico (L.s. CH₂Cl₂) de <i>L. spiralis</i> nas linhagens TA100 e TA98 de <i>S. typhimurium</i> na ausência (-S9) e na presença de metabolização (+S9).	127
42.	Atividade mutagênica expressa pelo número médio de revertentes/placa e razão de mutagenicidade (RM) dos extratos	128

	metanólico (L.s. MeOH) e diclorometânico (L.s. CH₂Cl₂) de <i>L. spiralis</i> nas linhagens TA97a e TA102 de <i>S. typhimurium</i> na ausência (-S9) e na presença de metabolização (+S9).	
43.	Atividade mutagênica expressa pelo número médio de revertentes/placa e razão de mutagenicidade (RM) das substâncias isolada, paepalantina, da planta <i>P. vellozioides</i> na linhagem TA97a de <i>S. typhimurium</i> na ausência (-S9) e na presença de metabolização (+S9).	132
44.	Atividade mutagênica expressa pela potência (número de revertentes) em linhagens de <i>S. typhimurium</i> expostas a substâncias isoladas de extratos de plantas da família Eriocaulaceae, na ausência (-S9) e na presença (+S9) de metabolização.	150

1. Revisão da literatura

1. 1. Cadeia do Espinhaço e a Serra do Cipó

Minas Gerais é um Estado que, devido às condições geológicas climáticas e topográficas especiais, apresenta uma variação de vegetação dificilmente encontrada em outras regiões do país. Destas condições resulta um ambiente rico em espécies vegetais e animais. Mesmo assim, sua flora ainda é pouco estudada, sendo que o complexo da Cadeia do Espinhaço apresenta um rico potencial químico e farmacológico a ser explorado pelos pesquisadores brasileiros (GIULIETTI et al., 2000).

A Cadeia do Espinhaço (Figura 1) prolonga-se desde a cidade de Belo Horizonte, em Minas Gerais, até Juazeiro, na Bahia, sendo uma imensa formação rochosa com altitudes que variam entre 900 a 1500 metros (GIULIETTI et al., 1987). Apresenta um extraordinário grau de endemismo de várias famílias de plantas e é considerado o centro da diversidade genética de plantas chamadas popularmente de “sempre-vivas”.

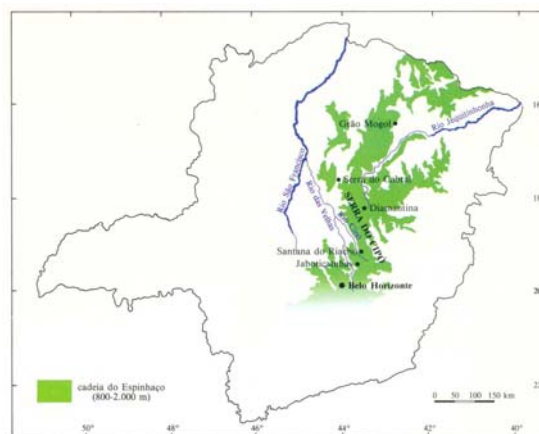


Figura 1. Mapa do Estado de Minas Gerais no qual se destaca a ocorrência da Cadeia do Espinhaço compreendida entre Belo Horizonte e o Estado da Bahia (MENEZES & GIULIETTI, 1986).

A Serra do Cipó, localizada a aproximadamente 100 quilômetros a noroeste de Belo Horizonte, apresenta altitudes que variam entre 1000 e 1800 metros. A média térmica anual

fica em torno de 21,2 °C e ocorre cerca de 1620 mm de precipitação pluviométrica em média (IBAMA, 2009).

A predominância da vegetação na Serra do Cipó são os campos rupestres (Figura 2), além de algumas áreas de cerrado que aparecem com menor frequência. As espécies mais frequentes presentes nos campos rupestres pertencem às famílias Gramineae, Cyperaceae, Eriocaulaceae, Xyridaceae e Velloziaceae (MENEZES e GIULIETTI, 1986).



Figura 2. Ambiente de desenvolvimento das Eriocaulaceae (FREEWAY BRASIL, 2007).

1. 2. Eriocaulaceae

A família Eriocaulaceae possui cerca de 1200 espécies divididas em várias categorias, tais como subgêneros, seções, subseções, séries até chegar às espécies ou até mesmo em subespécies. Esta subdivisão tem sido aceita por quase todos os pesquisadores e é baseada exclusivamente em caracteres morfológicos florais (GIULIETTI et al., 1996).

Os representantes de Eriocaulaceae possuem ampla distribuição e apresentam uma maior diversidade em espécies na América do Sul (GIULIETTI e HENSOLD, 1991). Estas plantas sobrevivem em condições especiais de clima e solo, o que leva ao aparecimento de um grande número de espécies endêmicas (JOLY, 1970). São conhecidas popularmente como

“sempre-vivas”, por suas inflorescências de coloração paleácea e de grande durabilidade (GIULIETTI, 1978). Algumas espécies são largamente usadas para fins de decoração (Figura 3) e produto de exportação do Brasil (MOLDENKE et al., 1976, *apud* DOKKEDAL, 2000). Este fato lhes confere alto valor comercial, principalmente no mercado internacional, e seu extrativismo constitui-se importante atividade econômica nas regiões onde ocorrem (GIULIETTI et al., 1988; DOKKEDAL, 2000).



Figura 3. Exemplos de sempre-vivas tingidas para venda (JARDIM DAS FLORES, 2004).

A comercialização (Figura 4) de “sempre-vivas” pela população que vive na Cadeia do Espinhaço (MG e BA) desenvolveu-se principalmente nas três últimas décadas e, certamente é decorrente do declínio da atividade mineradora nestas áreas que conheceram grande riqueza durante os ciclos do ouro e do diamante (GIULIETTI et al, 1996).

A coleta dessas plantas para exportação é responsável pelo sustento de inúmeras famílias da região, que, no entanto, praticam uma atividade extremamente predatória, utilizando fogo e desconhecendo completamente os riscos de extinção das mesmas. Após

coletadas, as plantas são vendidas para exportadores em Diamantina a preços baixíssimos, que por sua vez as exportam principalmente para o Japão, a preços cotados em dólar. A exploração é ilegal, mas tolerada pelo governo brasileiro (IBAMA, 2004).



Figura 4. Confeção artesanal de objetos usando as “sempre-vivas” como matéria-prima. (FREEWAY BRASIL, 2007).

Os escapos e as inflorescências de Eriocaulaceae são coletados antes ou durante a floração. Contudo, a coleta é sempre feita antes do completo desenvolvimento dos frutos, o que certamente afeta sensivelmente a produção por sementes. A coleta de “sempre-vivas” é inteiramente baseada em extrativismo a partir das populações naturais e feita por pessoas da própria região como meio de subsistência. Existe iniciativa privada trabalhando com cultivo de algumas espécies de Eriocaulaceae, principalmente *Syngonanthus elegans* (Bong.) Ruhland, apenas nas proximidades de Diamantina. O período principal da coleta concentra-se no primeiro semestre, quando ocorre floração da maioria das espécies de interesse econômico. O material recém-coletado é reunido em ramalhetes e vendido ao intermediário, que faz a ligação entre o coletor e os revendedores e exportadores. Esses últimos possuem, geralmente, grandes depósitos onde se completa a secagem das plantas, além do armazenamento e embalagem. Em alguns casos, as plantas são tingidas com corantes artificiais (GIULIETTI et al., 1996).

Ferreira et al. (1977) destacaram o aproveitamento comercial apresentando uma lista das espécies comercializadas em arranjos ornamentais com plantas secas de Minas Gerais, onde são analisados os dados de exportação no mesmo Estado. Aspectos referentes ao extrativismo, comercialização e exportação das espécies de Diamantina foram apresentados por Giulietti et al. (1988).

Preocupados com a extinção das sempre-vivas, foi criado em Minas Gerais o Parque Nacional das Sempre Vivas, situado na região de Inhaí, Diamantina, alto do Rio Jequitinhonha. Com 121 mil hectares, o Parque foi implantado com recursos oriundos de compensação por licenciamentos de atividades potencialmente impactantes do meio ambiente natural pelo IBAMA, situa-se numa região riquíssima em água, com inúmeras cachoeiras e caracterizada pela presença de matas de galeria e campos de altitude, na Serra do Espinhaço. O nome dado ao Parque refere-se às inúmeras espécies de "sempre-vivas" (IBAMA, 2004).

Além do valor ornamental, não é conhecido qualquer outro tipo de exploração comercial relacionado à família Eriocaulaceae (SANO, 1999; FIGUEIREDO, 2007). Já em relação às atividades farmacológicas relacionadas a essa família, são conhecidas algumas atividades como a antimicrobiana (DA SILVA et al., 2009), a antibacteriana (FANG et al., 2008), a antioxidante (CÁLGARO-HELENA et al., 2006), a citotóxica (DEVIIENNE et al., 2007; KITAGAWA et al., 2004), a antiinflamatória (DI STASI et al., 2004), a antiúlcera (BATISTA et al., 2004).

1. 3. *Eriocaulon*

O gênero *Eriocaulon* compreende 435 espécies distribuídas pela América, África, Ásia e Europa (MOLDENKE, 1971). Segundo Bongard (1831), *Eriocaulon* é um nome de origem grega que significa caule lanoso. Na América do Sul, algumas das espécies de *Eriocaulon* são conhecidas como aquáticas (GIULIETTI e HENSOLD, 1990).

É o único gênero da família que ocorre no continente asiático, com poucas espécies na antiga União Soviética e Mongólia e com maior número no Sul e Sudeste da Índia, onde ocorrem 66 espécies segundo Moldenke (1971). As plantas nesta região ocorrem geralmente em locais montanhosos, com altitudes em torno de 1.000 m, apesar de algumas espécies, como *E. pumilio* Hook., ocorrer no Himalaia, em até 3.000 m de altitude. Suas espécies habitam em geral locais muito úmidos ou são plantas aquáticas. Na América do Sul as espécies de *Eriocaulon* são também aquáticas ou paludosas e ocorrem especialmente em áreas montanhosas e de restingas, sendo registradas 72 espécies em 12 países (GIULIETTI e HENSOLD, 1990).

No Brasil são conhecidas 59 espécies deste gênero que são distribuídas desde o Amazonas até o Rio Grande do Sul. No entanto, a maior concentração está no Estado de Minas Gerais, onde 31 espécies foram encontradas, ocorrendo também nos Estados de São Paulo e Goiás (GIULIETTI, 1978).

No Brasil, ocorrem dois grupos de espécies bem distintas: aquelas cujas rosetas medem entre 5-15 cm de diâmetro, com capítulos medindo cerca de 5 cm de diâmetro e escuros, como *E. modestum* Kunth e *E. crassicapum* Bong., e aquelas com rosetas desenvolvidas com 20-60 cm de diâmetro, com capítulos medindo mais de 1 cm e claros, como *E. elichrysoides* Bong. e *E. ligulatum* Vell. (GIULIETTI e HENSOLD, 1990).

Existem também estudos de que algumas espécies foram registradas como ervas medicinais, sendo citadas na Matéria Médica da China em Kai Bao, possuindo atividades terapêuticas para tratamento dos olhos e dos dentes, como no caso de *Eriocaulon buergerianum* (TAO, 2003; XIE, 1996).

Eriocaulon ligulatum (Figura 5) é conhecido como “botão dourado”. Na literatura não existem muitas informações sobre esta espécie que é pertencente a um grupo natural de

monocotiledôneas herbáceas, caracterizadas por pequenas flores densamente arranjadas em capítulos (RICCI et al., 1996).

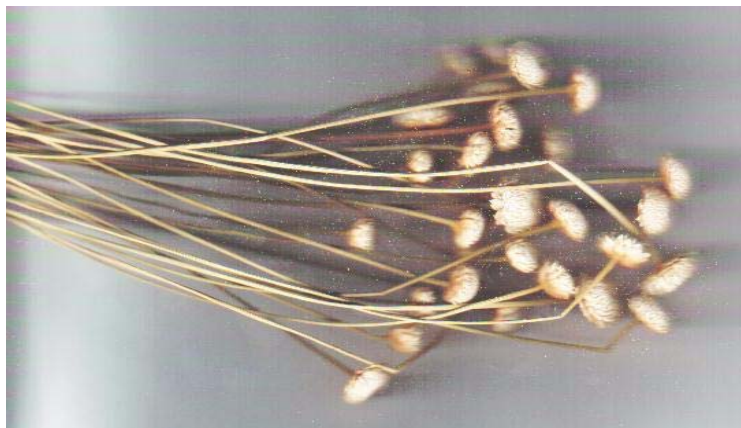


Figura 5 – Foto de *Eriocaulon ligulatum* (identificada pelo Prof. Dr. Paulo Takeo Sano - IB - USP). *Voucher* SANO 2973.

1. 4. *Leiothrix*

Segundo Ruhland (1903), *apud* Giulietti (1987), *Leiothrix* é um nome de origem grega que significa pêlo liso, o que diferenciaria as espécies deste gênero daquelas de *Paepalanthus* Kunth. *Leiothrix* Ruhland é um gênero exclusivo da América do Sul, com 37 espécies restritas ao Brasil. *L. flavescens* (Bong.) Ruhland ocorre no Brasil, Venezuela e Peru e *L. celiae* ocorre somente na Venezuela. As outras espécies são endêmicas em áreas do Estado de Minas Gerais e Bahia (GIULIETTI et al., 1988). Minas Gerais é considerado o centro de diversidade, com 30 espécies (GIULIETTI et al., 1995).

Leiothrix flavescens (Bong.) Ruhland (Figura 6) possui o nome vulgar de bolinha, botão-iris, capim-manso, sempre-viva-do-campo (SANTOS et al., 2001b). Esta espécie apresenta a mais ampla distribuição geográfica do gênero, ocorrendo em solos arenosos dos campos de altitude do Peru, Venezuela, Guianas e Brasil. É relativamente freqüente na Bahia, principalmente na Chapada Diamantina, sendo mais rara nas restingas litorâneas. A

comercialização desta espécie pode estar relacionada mais a facilidade de coleta do que à beleza do capítulo de cor castanha e com brácteas relativamente curtas (GIULIETTI et al., 1996).



Figura 6 – Excicata e Capítulo de *Leiothrix flavescens* (SANTOS, 2008).

L. spiralis (Figura 7), pertencente ao subgênero *Stephanophyllus* e tem um mecanismo de propagação vegetal a pseudoviviparidade. É endêmica no Estado de Minas Gerais, e considerada uma planta policárpica, com reprodução anual (COELHO et al., 2005).

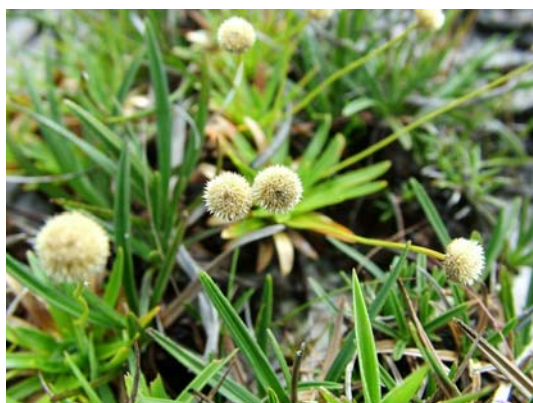


Figura 7 – Foto de *Leiothrix spiralis* (SANTOS, 2008).

1. 5. Importância dos estudos com plantas

Produtos derivados de plantas têm sido freqüentemente usados pela população humana no tratamento e prevenção de doenças (DIAS et al.,1995) e estima-se que mais de 80% da população mundial utiliza plantas como fonte primária de agentes terapêuticos (CORDELL, 1995; BASSO et al., 2005). Grande parte da população de países em desenvolvimento usa preparações vegetais como primeiros cuidados à saúde, isto porque estes são mais aceitos sob uma perspectiva cultural e também devido ao alto custo dos medicamentos alopáticos (ADDAE-MENSAH, 1992).

Nas últimas décadas, muitos estudos têm sido dirigidos à identificação de produtos naturais com propriedades terapêuticas (BAE et al, 2002; HAMBURGER e HOSTETMANN, 1991; SILVA et al., 1997; WEISBURGER et al., 1996). Plantas e seus metabólitos têm se tornado, para a indústria farmacêutica, valiosos recursos na pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos (VAN WYK et al., 1997).

Apesar da diversidade molecular e da importância farmacológica do reino vegetal serem incalculáveis, não se conhecem todas as propriedades dos compostos naturais (DOMINGO e LÓPEZ-BREA, 2003; HARVEY, 2000; SHU, 1998). A estrutura e o papel desses compostos nas interações biológicas dos organismos e nos seus ecossistemas vêm sendo mais estudados (BANERJI, 1992). Essas substâncias podem ser utilizadas diretamente ou servir de modelos para a síntese de novos princípios bioativos (DOMINGO e LÓPEZ-BREA, 2003).

As plantas possuem capacidade de sintetizar metabólitos primários e secundários (OJALA, 2001). Os metabólitos secundários, na maioria derivados do fenol, são produtos de baixo peso molecular, que são de natureza relativamente complexa e distribuição restrita, ao contrário das substâncias do metabolismo primário que apresentam uma distribuição universal (DOMINGO e LÓPEZ-BREA, 2003).

Por muitos anos, o papel dos metabólitos secundários foi negligenciado pela ciência, julgando-os como desperdício, sem aparente função (VERPOORTE, 1998). Entretanto, sua importância aumentou devido ao potencial para aplicações como medicamentos, cosméticos, alimentos e agroquímicos (PINTO, 2002).

Dentre os metabólitos secundários estão as fitoalexinas, que são substâncias com propriedades antimicrobianas produzidas pelas plantas quando estas são infectadas por microrganismos patogênicos (vírus, bactérias, fungos), ou produzidas sob condições de estresse, como clima árido, frio, ação de luz ultravioleta, dentre outros. As fitoalexinas aparecem, geralmente, em altas concentrações em resposta à infecção, desempenhando nos vegetais, um papel semelhante a dos anticorpos nos animais (PINTO, 2002).

Destacam-se entre as fitoalexinas, o grupo das cumarinas, devido às diferentes bioatividades que são atribuídas a alguns de seus membros (AL-BARWANI e ELTAYEB, 2004; DOMINGO e LÓPEZ-BREA, 2003). As cumarinas são metabólitos secundários de plantas, mas também podem ser encontradas em bactérias e fungos (MURRAY, 1989; AQUINO, 2003) e despertaram o interesse da indústria farmacêutica, por mostrarem propriedades farmacológicas diversas e relevantes, associadas à baixa toxicidade. Estão presentes em dietas alimentares e possuem custo relativamente reduzido (HOULT e PAYÁ, 1996).

Outro tipo de composto derivado do metabolismo secundário de plantas são os flavonóides, que representam uma classe de compostos polifenólicos contendo dois anéis aromáticos e um anel heterocíclico. Podem ser divididos em várias subclasses de acordo com o grau de oxidação deste último (HERTOG et al., 1993; RIMM et al., 1996).

A literatura reporta que, sob determinadas condições, algumas classes de flavonóides, como as flavonas e flavonóis, podem possuir atividade mutagênica e genotóxica em células

procarióticas e eucarióticas (DUARTE-SILVA et al., 1997a, 1997b, 1996a, 1996b; GASPAR et al., 1994; MACGREGOR e JURD, 1978; MULLER et al., 1991).

A toxicidade genética de alguns flavonóides tem sido avaliada em diversas plantas medicinais. Certos flavonóides são genotóxicos, enquanto que outros inibem a mutagenicidade e carcinogenicidade de outros mutágenos (BOUHLEL et al., 2009; KAUR et al., 2009; LIN et al., 2009; NAJAFZDEH et al., 2009; OGURA et al., 2008; PUGALENDHI et al., 2009; TAKUMI-KOBAYASHI et al., 2008; UTESCH et al., 2008; ZHANATAEV et al., 2008).

Portanto, é de extrema importância que se investiguem atividades biológicas nos produtos derivados das plantas, lembrando que sua utilização como um possível agente terapêutico tem de estar associada a testes que comprovem a ausência de propriedades indesejáveis, dentre os quais se destaca o teste de Ames.

1. 6. Atividade estrogênica

Dentro do contexto do uso de produtos naturais, verificou-se nos últimos anos que produtos obtidos de plantas têm sido bastante utilizados por mulheres no tratamento dos sintomas da menopausa (GELLER e KRONENBERG, 2003), que incluem calores súbitos, ansiedade, variações de humor, assim como aumento do risco de muitos problemas de saúde, tais como redução da densidade óssea, doenças cardiovasculares e tumores (HARLOW e SIGNORELLO, 2000).

Dentre os produtos com atividade estrogênica existentes destacam-se os hormônios presentes em cosméticos, anabolizantes utilizados em rações animais e fitoestrógenos (ALVES et al., 2007).

Fitoestrógenos são compostos não-esteroidais encontrados naturalmente em plantas, que contêm estrutura difenólica capaz de exercer atividade estrogênica (KURZER e XU,

1997). São capazes de mimetizar o hormônio humano 17- β estradiol (SETCHELL, 2001) e, com isso, podem interferir na ação do hormônio interagindo com receptores estrogênicos ou modulando concentrações de estrógeno endógeno (MATSUMURA et al., 2005).

Vários dos mais potentes fitoestrógenos conhecidos pertencem ao grupo dos isoflavonóides (Figura 8), constituintes fitoquímicos encontrados predominante nos grãos de soja. Eles pertencem à classe dos flavonóides, cujos compostos dividem com os estrógenos esteroidais a capacidade de ligar-se aos ER e mediar a transcrição de genes responsivos a estrógenos (BREINHOLT e LARSEN, 1998), e, por isso, vêm sendo fortemente sugeridos como uma alternativa natural à terapia de reposição hormonal (BENASSAYAG et al., 2002; BECK et al., 2005). Dados de Miksicek (1993, 1994) indicam que outros membros da família flavonóide, além dos isoflavonóides, exibem propriedades estrogênicas, e são designados flavo-estrógenos.

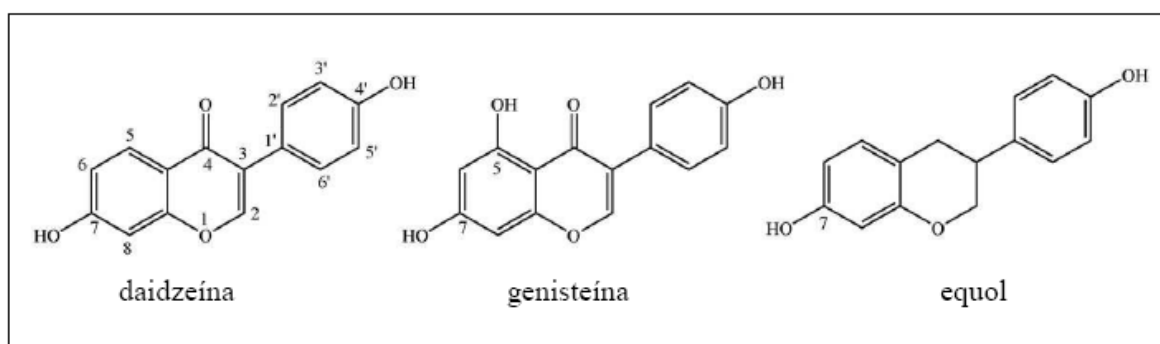


Figura 8. Estrutura química dos isoflavonóides de *Glycine max* (L.) Merrill (LEHMANN et al., 2005).

Uma ferramenta, que avalia a presença de interferentes endócrinos em amostras, muito utilizada atualmente, é o Teste RYA (Recombinant Yeast Assay). Esse teste inclui a utilização de células da levedura *Saccharomyces cerevisiae* geneticamente modificadas expressando um sensor, o receptor de estrógeno humano (HE0), e um reporter, contendo o elemento responsivo de estrógeno (ERE2) do gene da vitelogenina B1 de *Xenopus laevis*, o qual

promove a expressão da β -galactosidase pela ativação do gene lacZ (GARCIA-REYERO & PINA, 2005).

1. 7. Atividade mutagênica

Embora plantas medicinais venham sendo utilizadas no tratamento de doenças de acordo com o conhecimento acumulado ao longo dos tempos, a pesquisa científica tem mostrado que algumas substâncias presentes nessas plantas podem apresentar propriedades indesejáveis, como mutagenicidade, carcinogenicidade e toxicidade, as quais podem restringir seu uso como agentes terapêuticos (SIMÕES et al., 1999; DE SÁ FERREIRA et al., 1999).

Os testes de genotoxicidade/mutagenicidade fornecem uma avaliação do risco humano através da investigação do potencial que algumas substâncias têm de causar danos no material genético.

Mutagenicidade é definida como uma alteração permanente no conteúdo ou estrutura do material genético de um organismo. Pode ser manifestada como uma alteração herdável em decorrência de mutação em células germinativas e/ou mutações somáticas levando ao desenvolvimento de câncer ou outros processos crônicos degenerativos (DEARFIELD, 2002).

Para avaliar esse risco de uso de alguns tipos de substâncias, destacamos o teste de Ames. É um teste que é amplamente utilizado na avaliação da mutagenicidade de vários compostos, dentre eles os extratos de plantas medicinais comumente utilizadas, compostos químicos provenientes de metabolismo de drogas vegetais e sintéticas, os derivados de alimentos entre outros (BATRES-MARQUEZ et al., 2009; CARNEIRO et al., 2005; JIN et al., 2009; LEITE et al., 2005; TAIRA et al., 2005; VERSCHAEVE et al., 2004).

O teste de mutação gênica reversa com *Salmonella* (teste de Ames) tem sido utilizado para identificar mutágenos entre substâncias puras, em misturas, e em amostras ambientais. Este ensaio usa linhagens de bactérias contendo mutações no “operon” da histidina, o que as

torna incapazes de crescer na ausência deste aminoácido (histidina-dependentes), e também contêm outras mutações que conferem às células maior sensibilidade a xenobióticos mutagênicos (MARON e AMES, 1983). Na presença de mutágenos, uma ou mais dessas linhagens serão mutadas para o tipo selvagem (histidina independente) e serão identificadas pela sua habilidade de crescer e formar colônias na ausência de histidina.

Como pouco se sabe ainda sobre as substâncias que compõem a maioria das plantas e as conseqüências de seu uso, testes que avaliam o potencial mutagênico de materiais vegetais são de grande importância, sendo que seu uso tem um grande impacto na saúde de um grande número de pessoas (SOHNI et al., 1994).

1. 8. Relação Estrutura-Atividade

Estudos de relação estrutura-atividade de compostos naturais e sintéticos estão sendo cada vez mais estudados com o propósito de identificar e elucidar os mecanismos pelos quais certas substâncias agem (ANTCZAC et al., 2009; CAI et al., 2006; DJIOGUE et al., 2009; THOMPSON et al., 2000; YUAN et al., 2009).

Esses estudos podem contribuir, por exemplo, para o aumento do conhecimento científico a respeito de importantes Famílias de plantas medicinais, como o descrito por Cai et al. (2006), onde tradicionais plantas medicinais chinesas foram investigadas a respeito do seu potencial antioxidante e esses resultados foram relacionados às características estruturais das substâncias encontradas nessas plantas.

Estudos de relação estrutura-atividade com substâncias sintéticas também podem ser feitos e seus resultados podem contribuir para o desenvolvimento de candidatos a novas drogas, para melhorar a potência e a seletividade de drogas já existentes para tratamentos de doenças como o câncer (ANTCZAC et al., 2009).

2. Objetivos

2. 1. Objetivo Geral

O objetivo geral deste estudo foi o de avaliar as atividades mutagênica, utilizando o teste de Ames, e estrogênica, utilizando o teste RYA, de extratos, frações enriquecidas e substâncias isoladas das espécies *Eriocaulon ligulatum*, *Leiothrix flavescens*, *L. spiralis*, *Paepalanthus vellozioides*, *P. bromelioides* e *P. planifolius*.

2. 2. Objetivos específicos

- ✓ Avaliar a atividade estrogênica, através do ensaio RYA (Recombinant Yeast Assay), de:
 - Extratos metanólico e diclorometânico dos capítulos de *E. ligulatum*, bem como de suas frações enriquecidas e substâncias isoladas;
 - Extratos metanólico e diclorometânico dos capítulos de *L. flavescens*, bem como de suas frações enriquecidas e substâncias isoladas;
 - Extratos metanólico e diclorometânico das folhas de *L. spiralis*;
 - Isocumarinas isoladas de outras plantas da família Eriocaulaceae (paepalantina, de *P. vellozioides*; dímero 8-8' da paepalantina e paepalantinas mono e diheterosídicas, de *P. bromelioides*; planifolina, de *P. planifolius*);
 - Isocumarinas semi-sintéticas: paepalantinas 5, 6 e 7-acetiladas.

- ✓ Avaliar a mutagenicidade, através de ensaios de mutação gênica reversa com *S. typhimurium* (Teste de Ames), na presença e na ausência de metabolização, de:
 - Frações enriquecidas do extrato metanólico dos capítulos de *E. ligulatum*;

- Substâncias isoladas dos extratos metanólico e diclorometânico dos capítulos de *E. ligulatum*;
 - Extratos metanólico e diclorometânico dos capítulos de *L. flavescens*;
 - Extratos metanólico e diclorometânico das folhas de *L. spiralis*;
- ✓ Avaliar a relação estrutura-atividades estrogênica e mutagênica de alguns flavonóides e algumas isocumarinas isolados de plantas da família Eriocaulaceae.

3. Materiais e Métodos

3. 1. Obtenção do material vegetal

Todos os extratos, frações enriquecidas e substâncias isoladas das espécies de plantas avaliadas neste estudo foram obtidos no Instituto de Química da UNESP, campus Araraquara-SP, sob coordenação do Prof. Dr. Wagner Vilegas e Profa. Dra. Lourdes Campaner dos Santos. Na Tabela 1 estão dispostos os dados de quantidade e rendimento dos extratos das espécies estudadas.

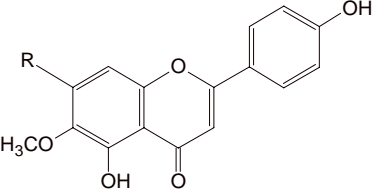
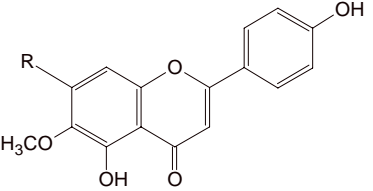
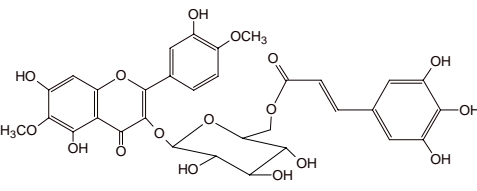
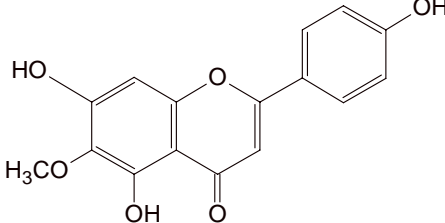
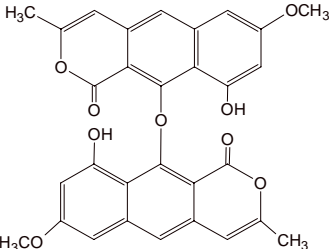
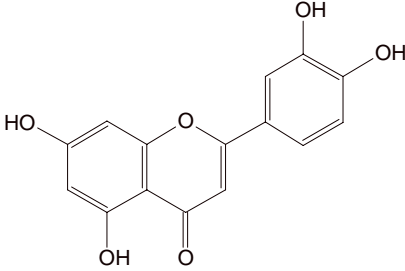
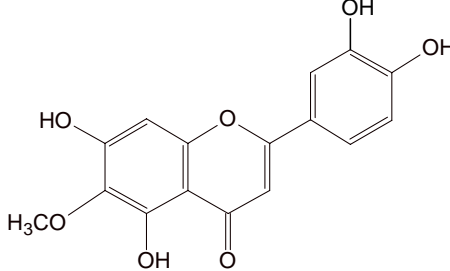
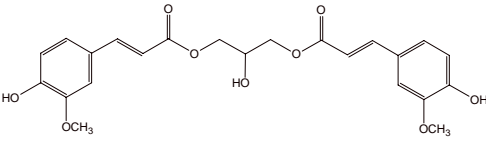
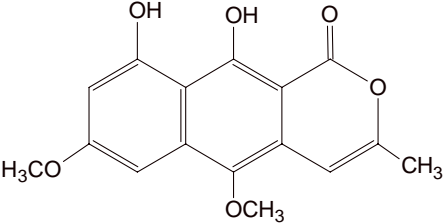
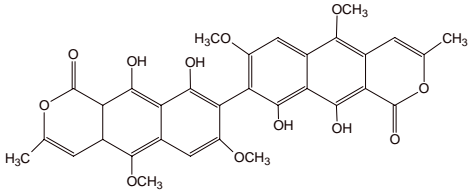
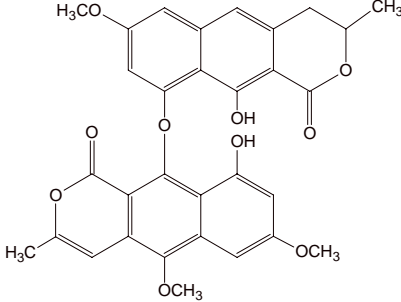
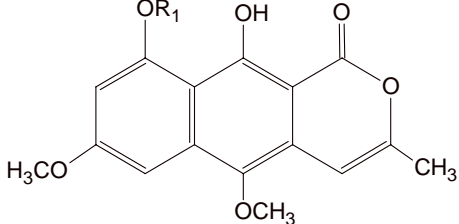
As estruturas das substâncias isoladas da família Eriocaulaceae, avaliadas neste trabalho, estão dispostas na Tabela 2.

Tabela 1. Quantidade obtida de extratos e seus rendimentos das espécies estudadas.

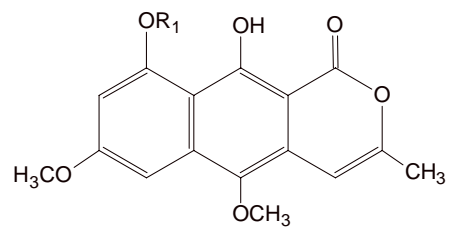
Espécies	Ex-Hex (g) Rend.	Ex-DCM (g) Rend.	Ex-MeOH (g) Rend.
<i>E. ligulatum</i> (capítulos)	(2,8) 0,9%	(4,3) 1,4%	(10,6) 3,5%
<i>L. flavescens</i> (capítulos)	(2,6) 0,85%	(3,6) 1,19%	(17,6) 5,86%
<i>L. spiralis</i> (capítulos)	(0,2) 0,05%	(0,1) 0,04%	(0,5) 0,15%
<i>L. spiralis</i> (escapos)	(0,3) 0,11%	(0,5) 0,16%	(1,7) 0,55%
<i>L. spiralis</i> (folhas)	(1,5) 0,48%	(1,7) 0,55%	(9,0) 2,99%

(Fonte: DA SILVA, 2008).

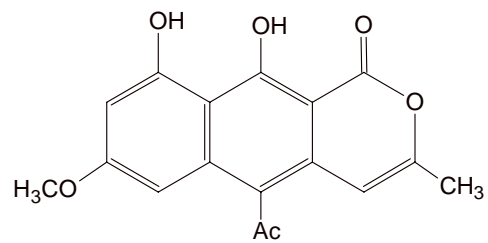
Tabela 2: Estruturas químicas das substâncias isoladas de diferentes espécies de plantas da família Eriocaulaceae, avaliadas quanto a sua estrogênica, mutagenicidade e relação estrutura-atividade.

<p>E.I. 1: 6-metoxiapigenina-7-<i>O</i>-β-D-glucopiranosídeo (R = O-Gluco)</p>	<p>E.I. 2: 6-metoxiapigenina-7-<i>O</i>-β-D-alopiranosídeo (R = O-Alo)</p>	<p>E.I. 3: 6, 4'-dimetoxicanferol-3-<i>O</i>-β-D-6''[(<i>E</i>) <i>p</i>-cumaroil] glucopiranosídeo</p>	<p>E.I. 4: 6-metoxiapigenina</p>
			
<p>E.I. 5: Eriocaulina</p>	<p>L.f. 1: luteolina</p>	<p>L.f. 2: 6-metoxiluteolina</p>	<p>L.f. 3: 1,3-diferuloilglicerol</p>
			
<p>paepalantina</p>	<p>dímero 8-8' da paepalantina</p>	<p>planifolina</p>	<p>paepalantina monoheterosídica (R₁ = gluco)</p>
			

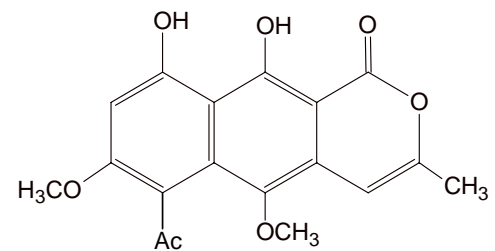
paepalantina diheterosídica
(R₁ = gluco 1→6 alo)



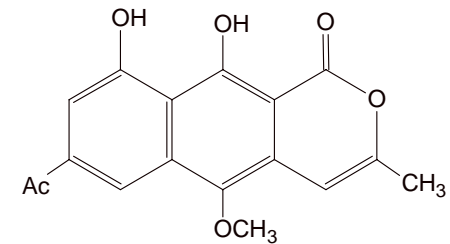
paepalantina 5-acetilada



paepalantina 6-acetilada



paepalantina 7-acetilada



3. 1. 1. *Eriocaulon ligulatum*

O material vegetal de *E. ligulatum* (Vell.) L.B. Smith. foi coletado no mês de maio de 1999, em Diamantina, Estado de Minas Gerais pelo prof. Dr. Paulo Takeo Sano do Instituto de Biociências da USP. As identificações foram feitas pelo mesmo, catalogadas com os números de exsicatas SANO 2978 (*E. ligulatum*) e depositadas no herbário do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.

A obtenção dos extratos, frações e substâncias isoladas de *E. ligulatum* está descrita em Santos et al., (2005) e da Silva et al.,(2007). Foram obtidos de seus capítulos dois extratos: metanólico (**E.I. MeOH**) e diclorometânico (**E.I. CH₂Cl₂**); quatro frações obtidas do extrato metanólico: Fração de flavonóides glicosilados (**FG**), Fração de flavonóides glicosilados + isocumarinas (**FGI**), Fração de flavonóides agliconas + isocumarinas (**FAI**) e Fração restante (**FR**); e cinco substâncias isoladas: 6-metoxiapigenina-7-*O*-β-D-glucopiranosídeo (**E.I. 1**), 6-metoxiapigenina-7-*O*-β-D-alopiranosídeo (**E.I. 2**), 6,4'-dimetoxicanferol-3-*O*-β-D-6''[(*E*)*p*-cumaroil]glucopiranosídeo (**E.I. 3**), 6-metoxiapigenina (**E.I. 4**) e Eriocaulina (**E.I. 5**).

3. 1. 2. *Leiothrix flavescens*

O material vegetal de *L. flavescens* foi coletado no mês de Maio de 2006, em Santana do Riacho (Serra do Cipó), Estado de Minas Gerais, pelo Prof. Dr. Paulo Takeo Sano do Instituto de Biociências da USP. As identificações foram feitas pelo mesmo, catalogadas com o número de exsicata CFCR 4463 (*L. flavescens*). A exsicata se encontra depositada no herbário do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.

A obtenção dos extratos, frações e substâncias isoladas de *L. flavescens* está descrita em Santos et al, (2001). Foram obtidos de seus capítulos dois extratos: metanólico (**L.f. MeOH**) e diclorometânico (**L.f. CH₂Cl₂**); cinco frações do extrato metanólico: Fração com o dímero 1,3 – diferuloilglicerol (**fração 1 L.f.**), Fração de xantonas (**fração 2 L.f.**), Fração de

xantonas puras (**fração 3 L.f.**), Fração de flavonóides glicosilados (**fração 4 L.f.**) e Fração de flavonóides agliconas (**fração 5 L.f.**); e três substâncias isoladas: luteolina (**L.f. 1**), 6 – metoxiluteolina (**L.f. 2**) e 1,3 – diferuloilglicerol (**L.f. 3**).

3. 1. 3. *Leiothrix spiralis*

O material vegetal de *L. spiralis* foi coletado no mês de Maio de 2006, em Santana do Riacho (Serra do Cipó), Estado de Minas Gerais, pelo Prof. Dr. Paulo Takeo Sano do Instituto de Biociências da USP. As identificações foram feitas pelo mesmo, catalogadas com o número de exsicata Sano 4798 (*L. spiralis*). A exsicata se encontra depositada no herbário do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.

A obtenção dos extratos de *L. spiralis* está descrita em Sumitani et al, (2007). De suas folhas foram obtidos dois extratos: metanólico (**L.s. MeOH**) e diclorometânico (**L.s. CH₂Cl₂**). Escolheu-se trabalhar com os extratos metanólico e diclorometânico das folhas de *L. spiralis*, pois foram os que apresentaram os melhores rendimentos (Tabela 1) e porque foi verificado também, através da análise fitoquímica, que capítulos e folhas de *L. spiralis* apresentam o mesmo perfil químico. Foi verificado também que as espécies *L. flavescens* e *L. spiralis* contêm o mesmo perfil químico (SUMITANI et al., 2007).

3. 1. 4. Obtenção de isocumarinas de outras plantas da família Eriocaulaceae

3. 1. 4. 1. Obtenção da paepalantina de *P. vellozioides* e *P. bromelioides*

A obtenção da isocumarina denominada “paepalantina” está descrita em Vilegas et al., (1990).

3. 1. 4. 2. Obtenção do dímero 8-8' da paepalantina e das paepalantinas mono e diglicosiladas de *P. bromelioides*

A obtenção das isocumarinas denominadas “dímero 8-8' da paepalantina”, paepalantina-9-*O*- β -D-glucopiranosídeo (paepalantina monoheterosídica) e paepalantina-9-*O*- β -D-alopiranosil (1 \rightarrow 6) glucopiranosídeo (paepalantina diheterosídica) está descrita em Vilegas et al., (1990), Coelho et al, (2000) e Santos et al, (1999).

3. 1. 4. 3. Obtenção da planifolina de *P. planifolius*

A obtenção da isocumarina denominada “planifolina” está descrita em Santos et al, (2001a).

3. 2. Obtenção das paepalantinas acetiladas

A obtenção das paepalantinas acetiladas foi feita através da reação da isocumarina paepalantina, isolada dos capítulos de *P. bromelioides*, com anidrido acético e piridina (VILEGAS, 1989).

3. 3. Teste RYA (Recombinant Yeast Assay)

3. 3. 1. Linhagem e plasmídeos utilizados

Para este experimento foi utilizada a linhagem BY4741 de *S. cerevisiae* (MATa *ura3 Δ 0 leu2 Δ 0 his3 Δ 1 met15 Δ 0*), obtida da EUROSCARF, Frankfurt, Alemanha. Os plasmídeos utilizados foram pH5HE0 (GREEN & CHAMBON, 1989), contendo o receptor de estrógeno humano (HE0), clonado no vetor de expressão constitutivo de levedura, pAAH5, e pVITB2x, derivado do pSFL Δ -178k, contendo o promotor CYC1 que regula o gene da β -galactosidase em *E. coli*. O plasmídeo pVITB2x contém o elemento responsivo a estrógeno (ERE2) do gene vitelogenina B1 de *X. laevis*.

3. 3. 2. Soluções e meios utilizados

As soluções e meios utilizados no ensaio RYA estão dispostos no Anexo I.

3. 3. 3. Inóculos de *S. cerevisiae*

A levedura BY4741 transformada com os plasmídeos pH5HE0 e pVITB2x foi descongelada do estoque à -70°C e crescida a 30°C, por 2-3 dias em meio mínimo sólido (base nitrogenada sem aminoácidos 1,7 g/L, sulfato de amônio (NH₄)₂SO₄ 5 g/L, glicose 40% 50 mL/L, Bacto Agar 20 g/L) com ausência de uracila e leucina (-Ura-Leu) suplementado dos aminoácidos prototróficos necessários (histidina 10% e metionina 10% 1 mL/L). A seguir, uma colônia isolada da placa de meio mínimo foi crescida em 3 mL de meio rico YPD líquido (extrato de levedura 10 g/L, peptona 20 g/L e glicose 40% 50 mL/L) por 16 horas. Então, 10 µL dessa cultura foram inoculados em 30 mL de meio mínimo líquido, o qual foi incubado a 30°C até ter atingido a D.O._{600nm} = 0,1 (mais ou menos 14 horas).

3. 3. 4. Controles

Foram feitos controles negativo (solvente da amostra – Metanol ou DMSO) e positivo (17-β-estradiol 10 nM/orifício), além dos controles de toxicidade, onde a segunda maior concentração da substância teste e estradiol foram colocados em contato com a levedura. A escolha da segunda concentração para o controle de toxicidade vem da necessidade de diminuir os erros de pipetagem, e da diluição seriada, pois a amostra colocada neste controle vem do poço correspondente à primeira concentração (1:10), mas acaba sendo diluído (1:30) no volume de leveduras, adicionado em todos os poços.

3.3.5. Avaliação da atividade estrogênica

O teste de RYA foi realizado como descrito em Garcia-Reyero & Piña, (2005). As amostras foram colocadas em microplacas de 96 orifícios, sendo que foram utilizadas 5 concentrações diferentes, ensaiadas em triplicata. As cinco concentrações testadas aqui foram obtidas através da verificação da citotoxicidade da amostra. A maior concentração testada, obtida do seu máximo de solubilidade, foi colocada em contato com a levedura e com o 17- β -estradiol. As unidades de fluorescência obtidas nos poços de citotoxicidade foram comparadas com as obtidas nos poços de controle positivo, que consideramos como 100%. Somente consideramos como válidas as amostras que tiveram o seu controle de toxicidade acima de 80%, quando estão abaixo desse valor, as amostras foram diluídas e testadas novamente.

Em cada orifício foram adicionados 50 μ L da cultura de leveduras com D.O. 0,1. As amostras foram submetidas à diluição seriada e os fatores de diluição foram: 1:10, 1:30, 1:90, 1:270 e 1:810. Após isso, a microplaca foi incubada por 6 horas a 30°C sob branda agitação. Decorrido esse período, 50 μ L de tampão de lise (Y-PER, Pierce, Rockford, USA) foram adicionados a cada orifício e a microplaca foi novamente incubada na mesma temperatura por mais 30 minutos. A seguir, foram adicionados em cada orifício 50 μ L de tampão fosfato pH 7,0, suplementado com 0,1% de mercaptoetanol e 0,5% da solução de 4-metilumbeliferona β -D-galactopiranosídeo (MuGal). Após breve centrifugação a 1.000 rpm, as microplacas foram lidas em espectrofotômetro (355 nm de excitação e 460nm de emissão). A fluorescência foi medida durante 20 minutos (uma medida por minuto) e os valores da atividade da β -galactosidase foram avaliados pelo aumento das unidades de fluorescência em relação ao tempo. Este ensaio quantifica a atividade estrogênica, a qual é calculada como equivalentes de estradiol (EEQ), que representa quanto de atividade estrogênica tem a substância testada, em porcentagem, em relação ao controle positivo, 17- β -estradiol, que tem a sua atividade estrogênica considerada como 100%.

3.3.6. Análise estatística

A análise estatística das substâncias testadas no teste RYA foi realizada através do Microsoft Excel e do Programa GraphPad Prisma. Foram calculadas as médias e seus respectivos desvios-padrão, cálculo da porcentagem de Estradiol Equivalente (EEq) de cada uma das 5 concentrações testadas de cada substância avaliada. Foi feita a análise de variância (ANOVA) e em seguida o teste de Tukey, que avaliou todos os tratamentos e os comparou entre si e com os controles negativo, positivo e de toxicidade. Utilizou-se para tanto um nível de significância de 5%.

O cálculo do estradiol equivalente (EEq) foi executado para avaliar a atividade estrogênica. Esse cálculo considerou como máxima (100%) a média, de todos os minutos, das unidades de fluorescência do controle positivo (17- β -estradiol) e comparando-a com a média das unidades de fluorescência obtidas para cada uma das concentrações testadas da substância teste e para os controles de toxicidade e negativo.

O estradiol equivalente geral (EEq geral) foi calculado somando-se as médias, de todos os minutos, das unidades de fluorescência de cada concentração testada e dividindo-se o resultado por 5 (número de concentrações testadas). Com isso, obteve-se uma média geral das unidades de fluorescência para a substância teste. Considerando-se o valor da média das unidades de fluorescência do controle positivo como 100% e comparando com a média geral obtida, obteve-se o valor do estradiol equivalente geral. Esse valor foi utilizado para a comparação de todas as substâncias analisadas neste trabalho juntamente com os controles de toxicidade, negativo e positivo.

Foram consideradas positivas para o teste RYA as amostras que apresentaram uma significância estatística entre pelo menos uma das concentrações testadas e o controle negativo.

3. 4. Teste de Ames

3. 4. 1. Linhagens utilizadas

Foram utilizadas as linhagens TA98, TA97a, TA100 e TA102 de *S. typhimurium*, gentilmente cedidas pelo Dr. Bruce Ames da Universidade de Berkeley, Califórnia, USA. A cepa TA98 apresenta mutação no gene *hisD* (*hisD3052*) que codifica para a histidinol desidrogenase, apresentando como ponto preferencial para a reversão oito resíduos repetitivos de GC e detecta compostos mutagênicos que causam deslocamento do quadro de leitura do DNA. A mutação *hisG46* presente na cepa TA100 ocorre no gene que codifica a primeira enzima do processo de biossíntese da histidina, através da substituição do códon selvagem GAG (CTC) – leucina, para o GGG (CCC) - prolina. Assim, essa cepa detecta agentes mutagênicos que ocasionam substituições, principalmente neste par G-C. A cepa TA102 contém a mutação *ochre* TAA no gene *hisG* e detecta eficientemente mutágenos como formaldeído, glioxal, vários hidroperóxidos, bleomicina, fenilidrazina, raios-X, luz UV, estreptonigrina e agentes *cross-link*, como mitomicina-C. A cepa TA97a também detecta mutágenos do tipo frameshift e apresenta mutação no gene *his D 6610* e alvo para mutação, os resíduos GC (MARON e AMES, 1983).

3. 4. 2. Manutenção e estoque das cepas de *S. typhimurium*

As cepas de *S. typhimurium* estão estocadas em tubos para congelamento (1,5 mL) à –70°C para que se mantenham inalteradas todas as suas características genéticas. Para cada 0,9 mL de cultura foi adicionado 0,1 mL de DMSO, substância crioprotetora.

3. 4. 3. Verificação das características genéticas das cepas de *S. typhimurium*

As características genéticas das cepas de *S. typhimurium* foram checadas rotineiramente, antes do preparo dos estoques para congelamento. A dependência da histidina,

presença de mutação *rfa*, presença de deleção *uvrB*, presença de plasmídios de resistência e taxa de reversão espontânea foram verificados de acordo com Maron e Ames (1983).

3. 4. 4. Preparo dos inóculos de *S. typhimurium* utilizados no ensaio

Com auxílio de alça de inoculação, pequena quantidade da cultura estoque congelada foi semeada em 30 mL de caldo nutriente (Oxoid nº 2), incubada a 37 °C, por 14 horas, em banho-maria (37 °C) com agitação (160 rpm), de modo a obter uma densidade de $1 - 2 \times 10^9$ bactérias/mL.

3. 4. 5. Meios de cultura

Os meios de cultura e soluções necessários para os ensaios de mutação reversa foram preparados de acordo com as especificações de Maron e Ames (1983).

O crescimento das linhagens de *S. typhimurium* foi realizado em caldo nutriente Oxoid nº 2. Nos ensaios de mutagenicidade foi usado ágar mínimo glicosado (AMG), constituído de ágar glicose (20 g de glicose, 15 g de Bacto ágar e 930 mL de água destilada) e Meio Vogel Bonner “E” 50x concentrado (10 g de sulfato de magnésio heptahidratado, 100 g de ácido cítrico, 175 g de fosfato de sódio e amônio, 500 g de fosfato de potássio dibásico e 670 mL de água destilada) na proporção de 980 mL para 20 mL respectivamente. Para os testes realizados com *S. typhimurium* TA97a o ágar mínimo foi preparado com apenas 8% de glicose devido à sensibilidade dessa linhagem a esse açúcar.

O ágar de superfície (“top-agar”) foi composto de 0,5 g de cloreto de sódio, 0,6 g de Bacto ágar e 100 mL de água destilada, acrescido de 10 mL de uma solução de L-histidina 0,096 mg/mL (Sigma) e D-biotina 0,123 mg/mL (Sigma).

Os meios de cultura foram preparados e esterilizados em autoclave a 121° C por 15 minutos quando não especificado.

3. 4. 6. Controles

O controle negativo foi feito com DMSO, o solvente dos extratos vegetais, frações e substâncias isoladas. O ensaio foi realizado incluindo-se também controles positivos para confirmar as propriedades de reversão e especificidade de cada cepa. Foram utilizados como controle positivo em ensaios sem ativação metabólica o 4-nitrofenilenodiamino (NPD) para as linhagens TA98 e TA97a, azida sódica para a linhagem TA100 e mitomicina C para a linhagem TA102 e para os ensaios com S9 foram usados o 2-antramino (TA98, TA100 e TA97a) e o 2-aminofluoreno (TA102).

3. 4. 7. Preparo da mistura S9

Foi utilizada a fração microsomal S9 homogeneizada de fígado de rato (fração pós-mitocondrial), suplementada com um cofator, preparada a partir de fígado de roedores tratados com agentes indutores de enzimas (aroclor 1254). A fração S9 revela se a substância ou amostra é mutagênica em sua forma original ou necessita ser metabolizada ou ativada para se tornar mutagênica. Essa fração foi obtida da MOLTOX (Molecular Toxicology, Inc. USA). Para o preparo da mistura S9, todas as soluções (cloreto de magnésio 0,4 M e cloreto de potássio 0,4 M, glicose-6-fosfato 1 M, β -nicotinamida adenina dinucleotídeofosfato 0,1 M, tampão fosfato 0,2 M pH 7,4 e água destilada) inclusive a fração S9 hidratada, foram mantidas em banho de gelo durante todo o ensaio e, preparadas sempre a fresco, utilizadas por um período de, no máximo, 3h.

3. 4. 8. Realização dos ensaios de mutagenicidade

Foi usada a metodologia de pré-incubação, desenvolvida por Maron e Ames (1983). Em tubos de ensaios foram colocados 0,1 mL de cultura de bactérias ($1-2 \times 10^9$ bactérias/mL), a concentração adequada da substância teste e 0,5 mL de tampão fosfato pH 7,4 ou 0,5 mL de

S9 mix (4%) nos ensaios com ativação metabólica. Os tubos assim compostos foram incubados a 37°C durante 20 minutos. Após esse tempo, foram adicionados 2 mL de ágar de superfície (top-agar) acrescido de uma solução de histidina e de biotina 0,05 mM na proporção de 10/100 mL. Em seguida, os tubos foram agitados e vertidos em placas de Petri que já continham o meio mínimo glicosado. Essas placas foram incubadas por 48 horas a 37 °C. Transcorrido esse tempo, foi efetuada a contagem das colônias revertentes. Todas as concentrações testadas, controles positivos e negativos foram realizados em triplicata.

As concentrações adequadas das substâncias teste são obtidas em ensaios “piloto”, nos quais colocou-se a maior concentração da substância teste (obtida no seu máximo de solubidade) em contato com a bactéria. Com isso, é possível avaliar a toxicidade da amostra, pois o número de colônias é contado e este é comparado com o valor médio de revertência espontânea específico para cada linhagem. Se este número for menor que a média de revertência espontânea, considera-se a amostra tóxica e esta deve ser diluída até que o valor de contagem das colônias seja igual ou maior que o valor da média de revertência espontânea.

3. 4. 9. Forma de análise dos resultados

Os dados da mutagenicidade dos extratos vegetais, frações e substâncias isoladas foram analisados utilizando o programa estatístico Salanal elaborado e gentilmente cedido pelo Dr. L. Myers do Research Triangle Institute, RTP, Carolina do Norte, USA, por intermédio da Dra. Maria Inês Sato (CETESB). Esse programa permite avaliar o efeito dose-resposta com o cálculo da análise de variância (ANOVA – teste F) entre as médias do número de revertentes nas diferentes doses testadas e o controle negativo, seguido de uma regressão linear. O modelo do programa escolhido para a análise dos dados foi o modelo Bernstein (BERNSTEIN et al., 1982). A partir dos resultados obtidos, foi calculada a razão de mutagenicidade (RM) para cada dose analisada, que é a média do número de revertentes na

placa teste (espontâneos mais induzidos) dividida pela média do número de revertentes por placa do controle negativo. A amostra foi considerada positiva quando a razão de mutagenicidade (RM) foi maior ou igual a 2 em pelo menos uma das doses testadas e quando houve uma relação dose resposta entre as concentrações testadas e o número de revertentes induzidos. Por sua vez, a amostra foi considerada negativa para o teste de Ames, quando a mesma não induziu aumento significativo no número de revertentes e seus RM forem todos menores que 2. Quando apenas um dos parâmetros foi atendido considerou-se a amostra com indícios de mutagenicidade.

3. 5. Avaliação da relação estrutura-atividades estrogênica e mutagênica das substâncias isoladas de plantas da família Eriocaulaceae

As características estruturais das substâncias isoladas das plantas da família Eriocaulaceae foram relacionadas às suas atividades estrogênica, avaliada pelo teste RYA, e mutagênica, avaliada pelo teste de Ames.

Para a relação estrutura-atividade estrogênica, as substâncias foram avaliadas como um todo, pois suas características estruturais foram comparadas às da molécula do estradiol. Usou-se a semelhança entre as características estruturais das substâncias isoladas das plantas e do estradiol para avaliar a atividade estrogênica.

Para estabelecer a relação estrutura-atividade mutagênica, as substâncias isoladas foram separadas em duas categorias: os flavonóides e as isocumarinas, pois se trata de compostos que têm características estruturais diferentes e que interagem com o material genético em sítios diferentes.

Além de essas moléculas serem avaliadas e comparadas entre si, elas também são comparadas com outras moléculas semelhantes isoladas da família Eriocaulaceae e com dados de relação estrutura-atividade relevantes de moléculas similares da literatura (CZECZOT et

al., 1990; NAGAO et al.,1981; SANDNESS et al., 1992; VARANDA et al., 1997, 2004 e 2006).

4. Resultados

4. 1. Teste RYA

Todos os dados da avaliação da atividade estrogênica, obtida através do teste RYA, foram dispostos em tabelas. Foram avaliadas 31 amostras, dentre elas extratos, frações e substâncias isoladas. Foram avaliadas 3 espécies, também avaliadas pelo teste de Ames, *E. ligulatum*, *L. flavescens*, *L. spiralis* e algumas isocumarinas obtidas de 3 outras espécies da mesma família Eriocaulaceae, paepalantina de *Paepalanthus vellozioides*; o dímero 8-8' da paepalantina e as paepalantinas mono e diheterosídicas de *P. bromelioides*; e a planifolina de *P. planifolius*. As isocumarinas semi sintéticas, analisadas neste estudo, foram obtidas através da molécula de paepalantina que sofreu modificações através de reações de acetilação.

Nas tabelas estão dispostos os dados como concentrações utilizadas de cada substância teste, controles de toxicidade, negativo e positivo, média das unidades de fluorescência e desvios-padrão, estradiol equivalentes (EEq) de cada concentração utilizada e equivalente geral da substância teste.

Foram consideradas positivas para o teste RYA as amostras que apresentaram uma significância estatística entre pelo menos uma das concentrações testadas e o controle negativo.

4. 1. 1. Teste RYA com extratos, frações enriquecidas e substâncias isoladas de *E. ligulatum*

- **Extratos:**

O extrato metanólico de *E. ligulatum* (**E.I. MeOH**) foi avaliado nas concentrações de 10,8; 3,6; 1,2; 0,4 e 0,13 µg/ orifício (Tabela 3) e o extrato diclorometânico de *E. ligulatum* (**E.I. CH₂Cl₂**) foi avaliado nas concentrações de 6,6; 2,2; 0,74; 0,25 e 0,08 µg/ orifício (Tabela 4).

Os resultados da análise estatística da avaliação da estrogenicidade destes dois extratos demonstraram que esses podem ser considerados negativos para o teste RYA, pois nenhuma de suas concentrações testadas foi estatisticamente diferente do controle negativo e nem houve uma relação dose-resposta entre as doses testadas.

Os controles de toxicidade e positivos, de ambos os extratos, diferiram estatisticamente de todas as concentrações testadas e do controle negativo.

De acordo com as Tabelas 3 e 4, podemos verificar que os extratos metanólico e diclorometânico de *E. ligulatum*, nas concentrações testadas, apresentaram, respectivamente uma viabilidade de 88% e 83% em relação ao controle positivo.

As Figuras 9 e 10 mostram a atividade estrogênica, expressa em estradiol equivalente (EEq), de cada uma das concentrações testadas dos extratos metanólico e diclorometânico de *E. ligulatum*, dos seus controles de toxicidade, negativo e positivo.

Pudemos observar que os extratos metanólico e diclorometânico de *E. ligulatum* não foram positivos para o teste RYA. Embora os dados da avaliação da estrogenicidade dos extratos tenham sido negativos, nós avaliamos as frações enriquecidas e substâncias isoladas dessa espécie, pois o teste RYA utiliza uma pequena quantidade de substância teste, ao contrário do teste de Ames, o que acaba viabilizando a avaliação de substâncias que estejam em mínima quantidade.

Tabela 3. Atividade estrogênica expressa através da média das unidades de fluorescência \pm desvio padrão e equivalentes de estradiol (EEq) para diferentes concentrações testadas do extrato metanólico de *E. ligulatum* (**E. I. MeOH**), além dos controles de toxicidade, negativo e positivo, na linhagem geneticamente modificada BY4741 de *S. cerevisiae*.

E. I. MeOH (ug/ orifício)	Média \pm DP	EEq (%)	EEq geral	
10,8	708 \pm 44	5	média fluorescência (5 concentrações) =	539
3,6	643 \pm 70	4		
1,2	493 \pm 59	3		
0,4	430 \pm 48	3		
0,13	421 \pm 64	3		
Controle de toxicidade	12832 \pm 1846	88	C+ =	14599
MeOH	311 \pm 56	2	EEq =	4%
Estradiol	14599 \pm 2704	100		

Controle de toxicidade: 2º maior concentração do extrato + 50 μ L de Estradiol 10 nM/ orifício; **MeOH:** controle negativo - 5 μ L de metanol em 45 μ L de cultura com D.O. 0,1 a 600 nm; **Estradiol:** controle positivo - 17- β -Estradiol 10 nM.

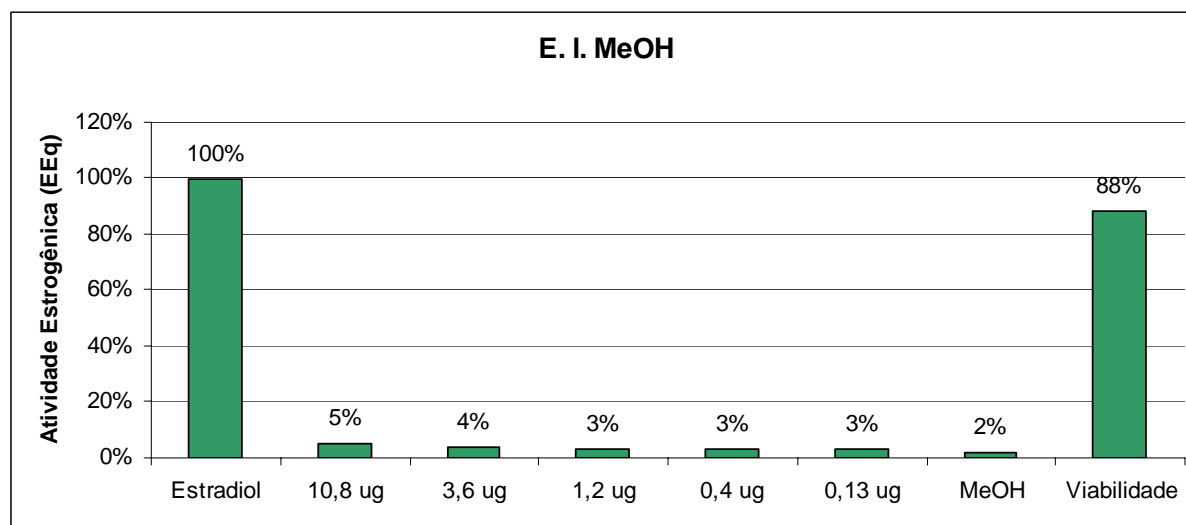


Figura 9. Atividade estrogênica expressa em Estradiol Equivalentes (EEq) para diferentes concentrações testadas do **extrato metanólico de *E. ligulatum* (E. I. MeOH)**, além dos controles de toxicidade, negativo e positivo, na linhagem geneticamente modificada BY4741 de *Saccharomyces cerevisiae*.

Tabela 4. Atividade estrogênica expressa através da média das unidades de fluorescência \pm desvio padrão e equivalentes de estradiol (EEq) para diferentes concentrações testadas do extrato diclorometânico de *E. ligulatum* (**E. I. CH₂Cl₂**), além dos controles de toxicidade, negativo e positivo, na linhagem geneticamente modificada BY4741 de *S. cerevisiae*.

E. I. CH₂Cl₂ (ug/ orifício)	Média \pm DP	EEq (%)	EEq geral	
6,6	792 \pm 180	7	média fluorescência (5 concentrações) =	573
2,2	443 \pm 52	4		
0,74	536 \pm 70	5		
0,25	559 \pm 70	5		
0,08	534 \pm 57	5		
Controle de toxicidade	9693 \pm 1652	83	C+ =	11735
MeOH	487 \pm 174	4	EEq =	5%
Estradiol	11735 \pm 2615	100		

Controle de toxicidade: 2º maior concentração do extrato + 50 μ L de Estradiol 10 nM/ orifício; **MeOH:** controle negativo - 5 μ L de metanol em 45 μ L de cultura com D.O. 0,1 a 600 nm; **Estradiol:** controle positivo - 17- β -Estradiol 10 nM.

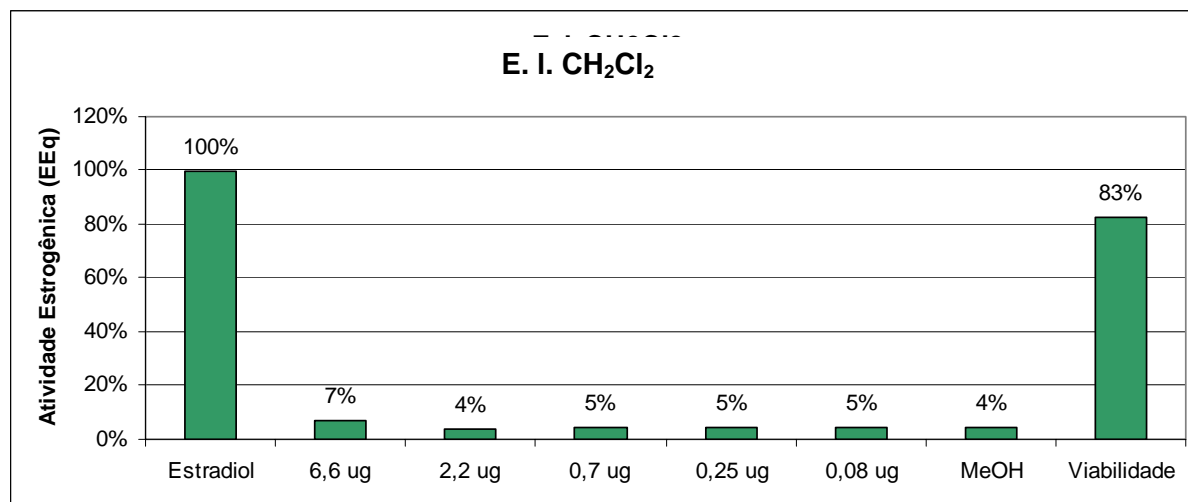


Figura 10. Atividade estrogênica expressa em Estradiol Equivalentes (EEq) para diferentes concentrações testadas do **extrato diclorometânico de *E. ligulatum* (E. I. CH₂Cl₂)**, além dos controles de toxicidade, negativo e positivo, na linhagem geneticamente modificada BY4741 de *Saccharomyces cerevisiae*.

- **Frações:**

A fração de flavonóides glicosilados (**FG**) foi avaliada nas concentrações de 104,4; 34,8; 11,6; 3,9 e 1,3 µg/ orifício (Tabela 5); a fração de flavonóides glicosilados mais isocumarinas (**FGI**) foi avaliada nas concentrações de 25,0; 8,4; 2,8; 0,9 e 0,3 µg/ orifício (Tabela 6); a fração de flavonóides agliconas mais isocumarinas (**FAI**) foi avaliada nas concentrações de 6,4; 2,1; 0,7; 0,24 e 0,08 µg/ orifício (Tabela 7) e a fração restante (**FR**) foi avaliada nas concentrações de 14,4; 4,8; 1,6; 0,5 e 0,18 µg/ orifício (Tabela 8).

Os resultados da análise estatística da avaliação da estrogenicidade destas quatro frações enriquecidas demonstraram que três dessas podem ser consideradas negativas para o teste RYA, pois nenhuma de suas concentrações testadas foi estatisticamente diferente do controle negativo e nem houve uma relação dose-resposta entre as doses testadas.

Já a fração FAI foi considerada positiva para o teste RYA, pois a sua segunda concentração (2,1 µg/ orifício) foi estatisticamente diferente do controle negativo. Houve significância entre a primeira (6,4 µg/ orifício) e a segunda concentrações; entre a segunda e a terceira (0,7 µg/ orifício); entre a segunda e a quarta (0,24 µg/ orifício) e entre a segunda e a quinta (0,08 µg/ orifício) concentrações.

Os controles de toxicidade e positivos, de todas as frações, diferiram estatisticamente de todas as concentrações testadas e do controle negativo.

De acordo com as Tabelas 5, 6, 7 e 8 podemos verificar que as frações **FG**, **FGI**, **FAI** e **FR**, nas concentrações testadas, apresentaram, respectivamente uma viabilidade de 82%, 80%, 87% e 80% em relação ao controle positivo.

As Figuras 11 a 14 mostram a atividade estrogênica, expressa em estradiol equivalente (EEq), de cada uma das concentrações testadas das frações **FG**, **FGI**, **FAI** e **FR**, obtidas do extrato metanólico de *E. ligulatum*, dos seus controles de toxicidade, negativo e positivo.

Tabela 5. Atividade estrogênica expressa através da média das unidades de fluorescência \pm desvio padrão e equivalentes de estradiol (EEq) para diferentes concentrações testadas da Fração de Flavonóides Glicosilados (FG) do extrato metanólico de *E. ligulatum*, além dos controles de toxicidade, negativo e positivo, na linhagem geneticamente modificada BY4741 de *S. cerevisiae*.

FG (ug/orifício)	Média \pm DP	EEq (%)	EEq geral	
104,4	681 \pm 71	4	média fluorescência (5 concentrações) = C+ = EEq =	660 17934 4%
34,8	696 \pm 112	4		
11,6	689 \pm 201	4		
3,9	646 \pm 208	4		
1,3	585 \pm 168	3		
Controle de toxicidade	14724 \pm 3536	82		
MeOH	535 \pm 154	3		
Estradiol	17934 \pm 4564	100		

Controle de toxicidade: 2º maior concentração da fração + 50 μ L de Estradiol 10 nM/ orifício; **MeOH:** controle negativo - 5 μ L de metanol em 45 μ L de cultura com D.O. 0,1 a 600 nm; **Estradiol:** controle positivo – 17- β -Estradiol 10 nM.

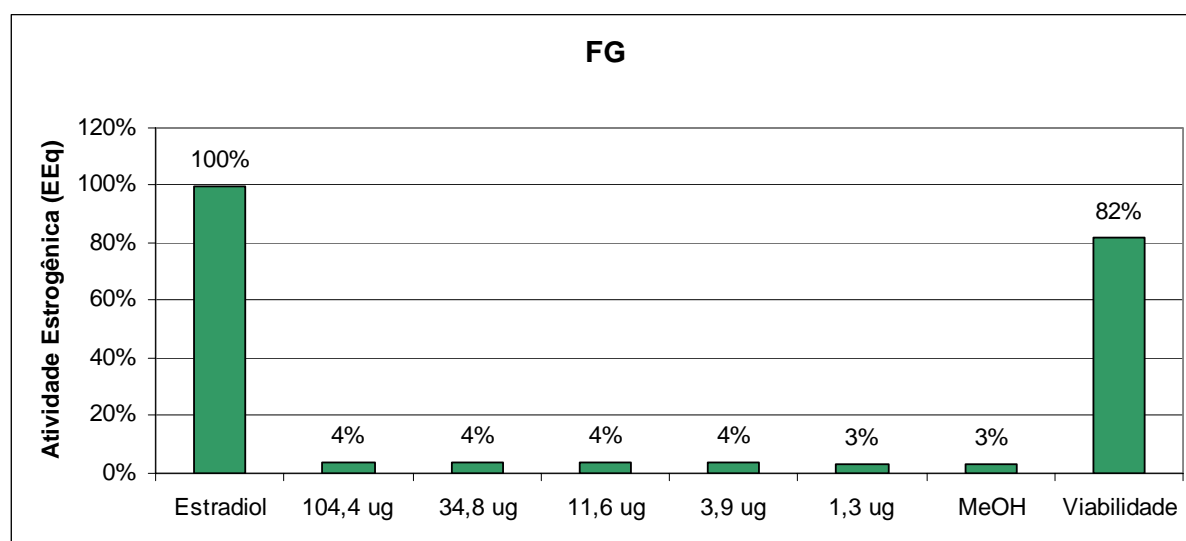


Figura 11. Atividade estrogênica expressa em Estradiol Equivalentes (EEq) para diferentes concentrações testadas da Fração de Flavonóides Glicosilados (FG) do extrato metanólico de *Eriocaulon ligulatum*, além dos controles de toxicidade, negativo e positivo, na linhagem geneticamente modificada BY4741 de *Saccharomyces cerevisiae*.

Tabela 6. Atividade estrogênica expressa através da média das unidades de fluorescência \pm desvio padrão e equivalentes de estradiol (EEq) para diferentes concentrações testadas da Fração de Flavonóides Glicosilados + Isocumarinas (FGI) do extrato metanólico de *E. ligulatum*, além dos controles de toxicidade, negativo e positivo, na linhagem geneticamente modificada BY4741 de *S. cerevisiae*.

FGI (ug/orifício)	Média \pm DP	EEq (%)	EEq geral	
25,0	817 \pm 100	5	média fluorescência (5 concentrações) =	691
8,4	743 \pm 95	4		
2,8	670 \pm 91	4		
0,9	632 \pm 94	4		
0,3	594 \pm 99	3		
Controle de toxicidade	14032 \pm 1030	80	C+ =	17544
MeOH	473 \pm 97	3	EEq =	4%
Estradiol	17544 \pm 2953	100		

Controle de toxicidade: 2º maior concentração da fração + 50 μ L de Estradiol 10 nM/ orifício; **MeOH:** controle negativo - 5 μ L de metanol em 45 μ L de cultura com D.O. 0,1 a 600 nm; **Estradiol:** controle positivo - 17- β -Estradiol 10 nM.

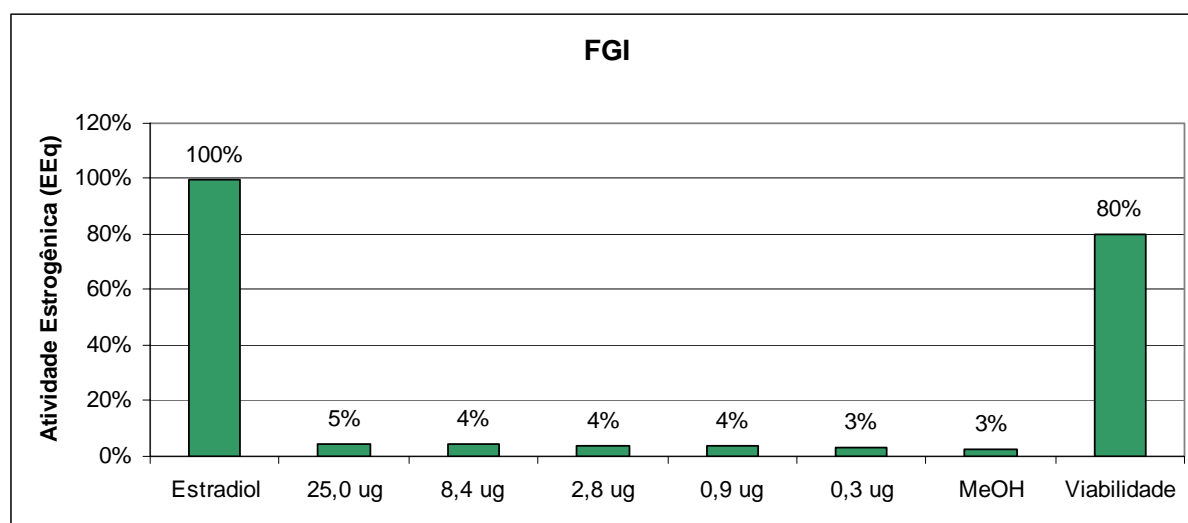


Figura 12. Média das unidades de fluorescência \pm desvio padrão obtidos para diferentes concentrações testadas da Fração de Flavonóides Glicosilados + Isocumarinas (FGI) do extrato metanólico de *Eriocaulon ligulatum*, além dos controles de toxicidade, negativo e positivo, na linhagem geneticamente modificada BY4741 de *Saccharomyces cerevisiae*.

Tabela 7. Atividade estrogênica expressa através da média das unidades de fluorescência \pm desvio padrão e equivalentes de estradiol (EEq) para diferentes concentrações testadas da Fração de Flavonóides Agliconas + Isocumarinas (FAI) do extrato metanólico de *E. ligulatum*, além dos controles de toxicidade, negativo e positivo, na linhagem geneticamente modificada BY4741 de *S. cerevisiae*.

FAI (ug/orifício)	Média \pm DP	EEq (%)	EEq geral	
6,4	282 \pm 34	2	média fluorescência (5 concentrações) =	1023
2,1	2725 \pm 564*	16		
0,7	906 \pm 198	5		
0,24	614 \pm 119	3		
0,08	590 \pm 104	3		
Controle de toxicidade	15220 \pm 1768	87	C+ =	17544
MeOH	473 \pm 97	3	EEq =	6%
Estradiol	17544 \pm 2953	100		

Controle de toxicidade: 2º maior concentração da fração + 50 μ L de Estradiol 10 nM/ orifício; **MeOH:** controle negativo - 5 μ L de metanol em 45 μ L de cultura com D.O. 0,1 a 600 nm; **Estradiol:** controle positivo - 17- β -Estradiol 10 nM. * - Resultado estatisticamente significativo em relação ao controle negativo (P<0,05).

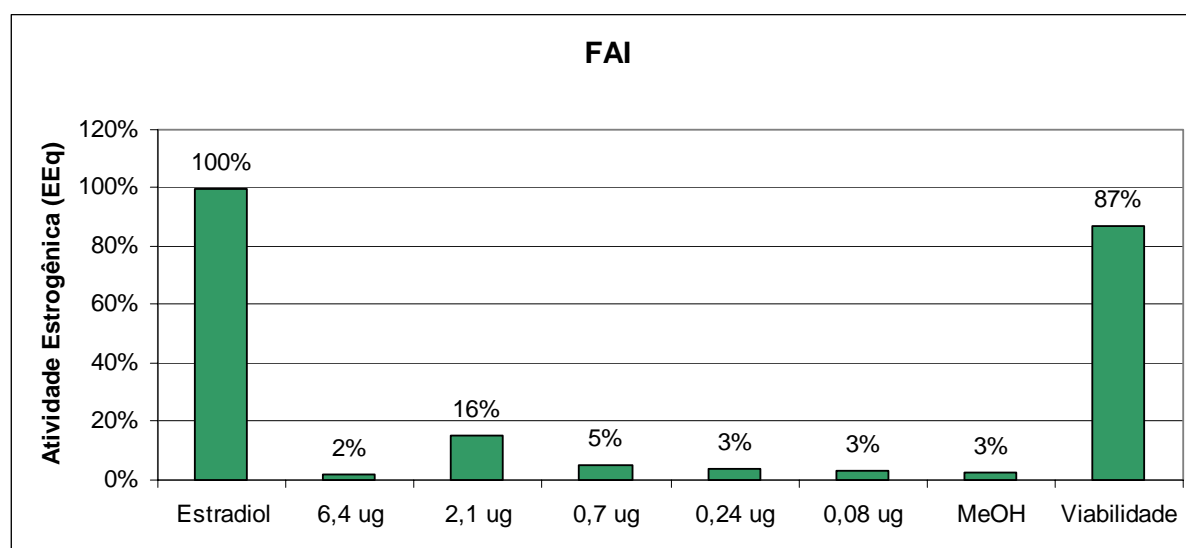


Figura 13. Média das unidades de fluorescência \pm desvio padrão obtidos para diferentes concentrações testadas da Fração de Flavonóides Agliconas + Isocumarinas (FAI) do extrato metanólico de *Eriocaulon ligulatum*, além dos controles de toxicidade, negativo e positivo, na linhagem geneticamente modificada BY4741 de *Saccharomyces cerevisiae*.

Tabela 8. Atividade estrogênica expressa através da média das unidades de fluorescência \pm desvio padrão e equivalentes de estradiol (EEq) para diferentes concentrações testadas da Fração Restante (FR) do extrato metanólico de *E. ligulatum*, além dos controles de toxicidade, negativo e positivo, na linhagem geneticamente modificada BY4741 de *S. cerevisiae*.

FR (ug/ orifício)	Média \pm DP	EEq (%)	EEq geral	
14,4	547 \pm 92	3	média fluorescência (5 concentrações) = C+ = EEq =	561 17544 3%
4,8	576 \pm 110	3		
1,6	560 \pm 92	3		
0,5	559 \pm 96	3		
0,18	564 \pm 102	3		
Controle de toxicidade	14037 \pm 1684	80		
MeOH	473 \pm 97	3		
Estradiol	17544 \pm 2953	100		

Controle de toxicidade: 2º maior concentração da fração + 50 μ L de Estradiol 10 nM/ orifício; **MeOH:** controle negativo - 5 μ L de metanol em 45 μ L de cultura com D.O. 0,1 a 600 nm; **Estradiol:** controle positivo - 17- β -Estradiol 10 nM.

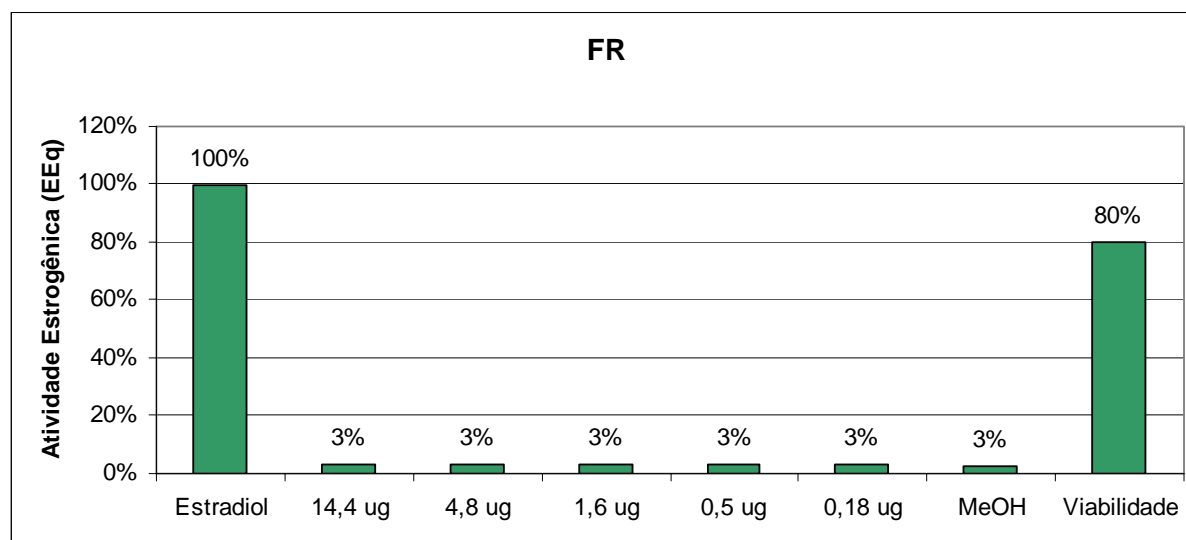


Figura 14. Atividade estrogênica expressa em Estradiol Equivalentes (EEq) para diferentes concentrações testadas da **Fração Restante (FR)** do extrato metanólico de *Eriocaulon ligulatum*, além dos controles de toxicidade, negativo e positivo, na linhagem geneticamente modificada BY4741 de *Saccharomyces cerevisiae*.

- **Substâncias isoladas:**

A substância isolada 6-metoxiapigenina-7-*O*- β -D-glucopiranosídeo (**E.I. 1**) foi avaliada nas concentrações de 7,8; 2,6; 0,87; 0,29 e 0,10 $\mu\text{g/}$ orifício (Tabela 9); a substância isolada 6-metoxiapigenina-7-*O*- β -D-alopiranosídeo (**E.I. 2**) foi avaliada nas concentrações de 10,8; 3,6; 1,2; 0,4 e 0,13 $\mu\text{g/}$ orifício (Tabela 10); a substância isolada 6,4'-dimetoxicanferol-3-*O*- β -D-6''[(*E*) *p*-cumaroil] glucopiranosídeo (**E.I. 3**) foi avaliada nas concentrações de 3,3; 1,1; 0,4; 0,12 e 0,04 $\mu\text{g/}$ orifício (Tabela 11); a substância isolada 6-metoxiapigenina (**E.I. 4**) foi avaliada nas concentrações de 56,7; 18,8; 6,3; 2,1 e 0,7 $\mu\text{g/}$ orifício (Tabela 12) e a substância isolada eriocaulina (**E.I. 5**) foi avaliada nas concentrações de 0,6; 0,2; 0,07; 0,02 e 0,007 $\mu\text{g/}$ orifício (Tabela 13).

Os resultados da análise estatística da avaliação da estrogenicidade destas cinco substâncias demonstraram que essas podem ser consideradas negativas para o teste RYA, pois nenhuma de suas concentrações testadas foi estatisticamente diferente do controle negativo e nem houve uma relação dose-resposta entre as doses testadas.

Os controles de toxicidade e positivos, de todas as substâncias isoladas, diferiram estatisticamente de todas as concentrações testadas e do controle negativo.

De acordo com as Tabelas 9, 10, 11, 12 e 13 podemos verificar que as substâncias isoladas **E.I. 1**, **E.I. 2**, **E.I. 3**, **E.I. 4** e **E.I. 5**, nas concentrações testadas, apresentaram, respectivamente uma viabilidade de 81%, 85%, 84%, 92% e 85% em relação ao controle positivo.

As Figuras 15 a 19 mostram a atividade estrogênica, expressa em estradiol equivalente (EEq), de cada uma das concentrações testadas das substâncias isoladas, **E.I. 1**, **E.I. 2**, **E.I. 3**, **E.I. 4** e **E.I. 5**, do extrato metanólico de *E. ligulatum*, dos seus controles de toxicidade, negativo e positivo.

Tabela 9. Atividade estrogênica expressa através da média das unidades de fluorescência \pm desvio padrão e equivalentes de estradiol (EEq) para diferentes concentrações testadas da substância isolada 6-metoxiapigenina-7-O- β -D-glucopiranosídeo (**E.I. 1**) do extrato metanólico de *E. ligulatum*, além dos controles de toxicidade, negativo e positivo, na linhagem geneticamente modificada BY4741 de *S. cerevisiae*.

E.I. 1 (ug/orifício)	Média \pm DP	EEq (%)	EEq geral	
7,8	345 \pm 61	2	média fluorescência (5 concentrações) = C+ = EEq =	455 17544 3%
2,6	170 \pm 63	2		
0,87	218 \pm 91	3		
0,29	193 \pm 114	3		
0,10	187 \pm 107	3		
Controle de toxicidade	14168 \pm 1825	81		
DMSO	475 \pm 97	3		
Estradiol	17544 \pm 2953	100		

Controle de toxicidade: 2º maior concentração da substância + 50 μ L de Estradiol 10 nM/ orifício; **DMSO:** controle negativo - 5 μ L de metanol em 45 μ L de cultura com D.O. 0,1 a 600 nm; **Estradiol:** controle positivo – 17- β -Estradiol 10 nM.

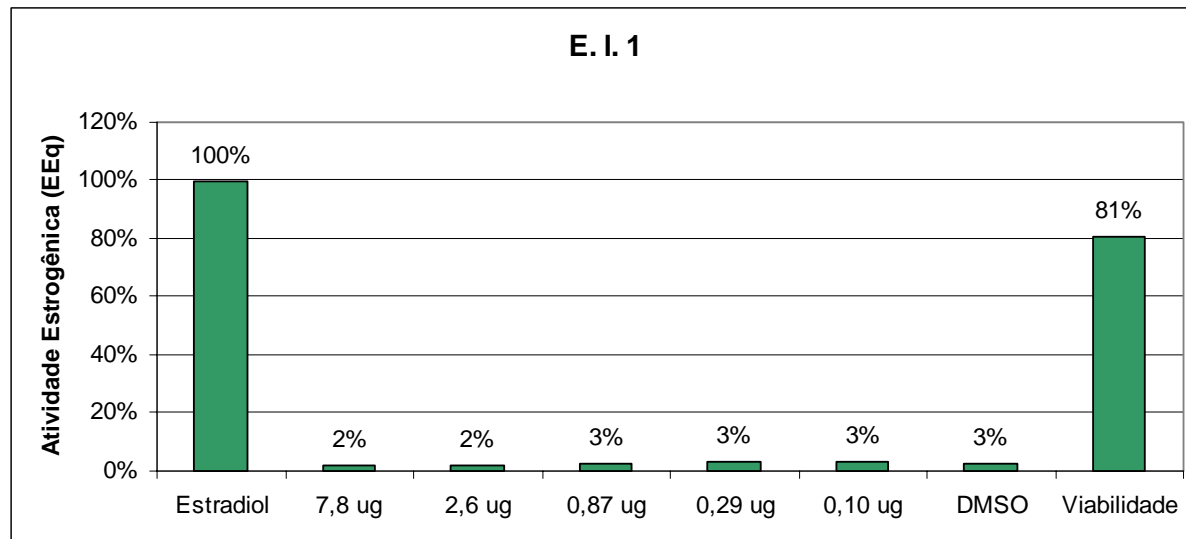


Figura 15. Atividade estrogênica expressa em Estradiol Equivalentes (EEq) para diferentes concentrações testadas da substância isolada **6-metoxiapigenina-7-O- β -D-glucopiranosídeo** (**E.I. 1**) do extrato metanólico de *Eriocaulon ligulatum*, além dos controles de toxicidade, negativo e positivo, na linhagem geneticamente modificada BY4741 de *Saccharomyces cerevisiae*.

Tabela 10. Atividade estrogênica expressa através da média das unidades de fluorescência \pm desvio padrão e equivalentes de estradiol (EEq) para diferentes concentrações testadas da substância isolada 6-metoxiapigenina-7-O- β -D-alopiranosídeo (**E.I. 2**) do extrato metanólico de *E. ligulatum*, além dos controles de toxicidade, negativo e positivo, na linhagem geneticamente modificada BY4741 de *S. cerevisiae*.

E.I. 2 (ug/orifício)	Média \pm DP	EEq (%)	EEq geral	
10,8	275 \pm 47	4	média fluorescência (5 concentrações) = C+ = EEq =	259 6494 4%
3,6	252 \pm 51	4		
1,2	245 \pm 51	4		
0,4	255 \pm 54	4		
0,13	268 \pm 74	4		
Controle de toxicidade	5538 \pm 1636	85		
DMSO	209 \pm 64	3		
Estradiol	6494 \pm 2322	100		

Controle de toxicidade: 2^o maior concentração da substância + 50 μ L de Estradiol 10 nM/ orifício; **DMSO:** controle negativo - 5 μ L de metanol em 45 μ L de cultura com D.O. 0,1 a 600 nm; **Estradiol:** controle positivo – 17- β -Estradiol 10 nM.

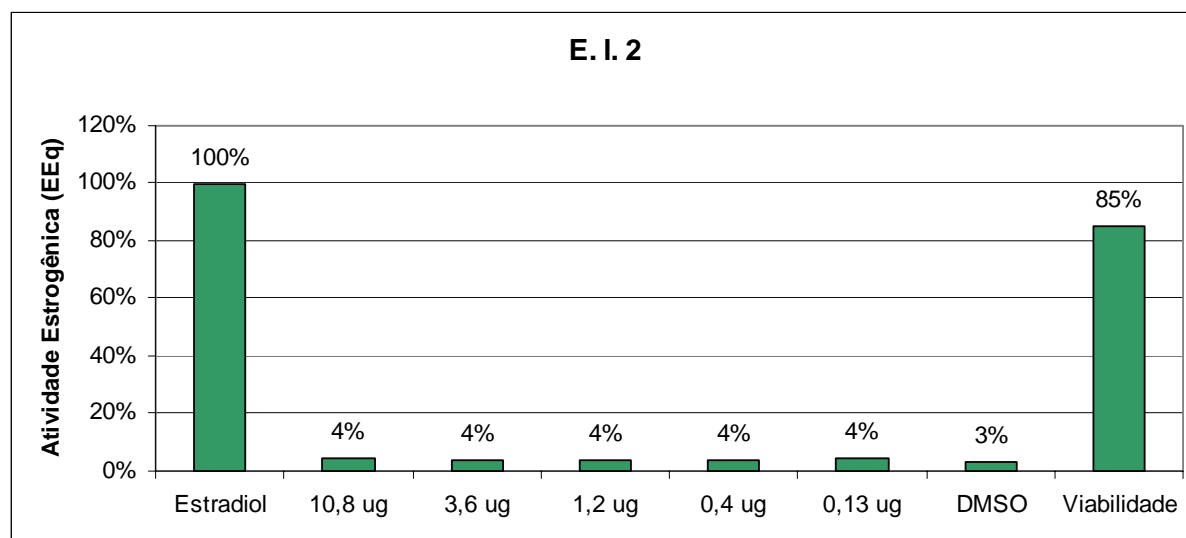


Figura 16. Atividade estrogênica expressa em Estradiol Equivalentes (EEq) para diferentes concentrações testadas da substância isolada **6-metoxiapigenina-7-O- β -D-alopiranosídeo (E.I. 2)** do extrato metanólico de *Eriocaulon ligulatum*, além dos controles de toxicidade, negativo e positivo, na linhagem geneticamente modificada BY4741 de *Saccharomyces cerevisiae*.

Tabela 11. Atividade estrogênica expressa através da média das unidades de fluorescência \pm desvio padrão e equivalentes de estradiol (EEq) para diferentes concentrações testadas da substância isolada 6,4'-dimetoxicanferol-3-O- β -D-6''[(E) p-cumaroil] glucopiranosídeo (**E.I. 3**) do extrato metanólico de *E. ligulatum*, além dos controles de toxicidade, negativo e positivo, na linhagem geneticamente modificada BY4741 de *S. cerevisiae*.

E.I. 3 (ug/orifício)	Média \pm DP	EEq (%)	EEq geral	
3,3	340 \pm 154	5	média fluorescência (5 concentrações) = C+ = EEq =	259 6494 4%
1,1	209 \pm 70	3		
0,4	223 \pm 58	3		
0,12	250 \pm 85	4		
0,04	203 \pm 82	3		
Controle de toxicidade	5431 \pm 1668	84		
DMSO	209 \pm 64	3		
Estradiol	6494 \pm 2322	100		

Controle de toxicidade: 2^o maior concentração da substância + 50 μ L de Estradiol 10 nM/ orifício; **DMSO:** controle negativo - 5 μ L de metanol em 45 μ L de cultura com D.O. 0,1 a 600 nm; **Estradiol:** controle positivo - 17- β -Estradiol 10 nM.

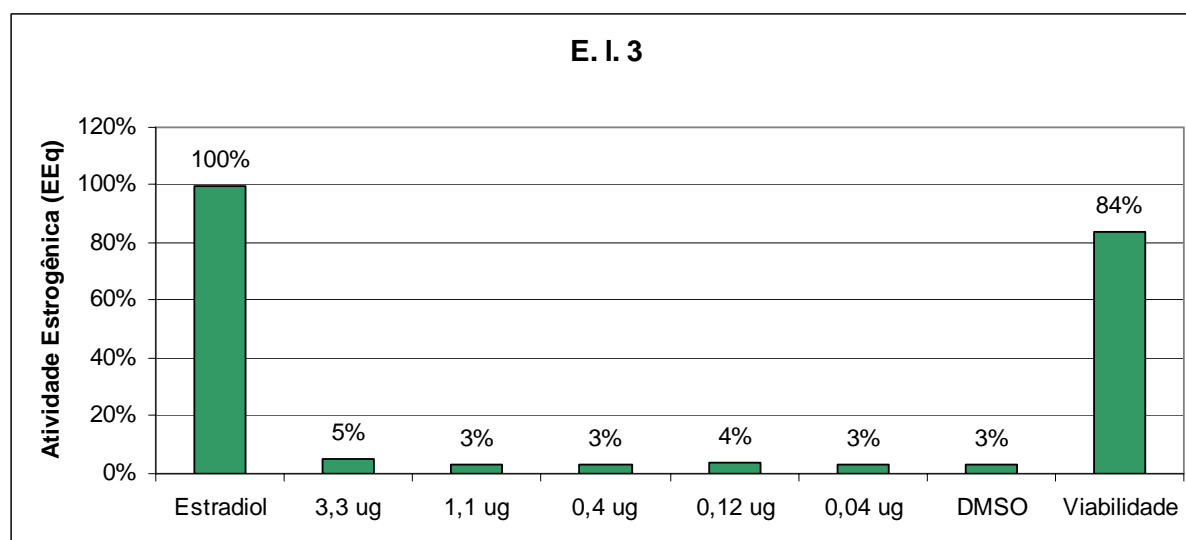


Figura 17. Atividade estrogênica expressa em Estradiol Equivalentes (EEq) para diferentes concentrações testadas da substância isolada 6,4'-dimetoxicanferol-3-O- β -D-6''[(E) p-cumaroil] glucopiranosídeo (**E.I. 3**) do extrato metanólico de *Eriocaulon ligulatum*, além dos controles de toxicidade, negativo e positivo, na linhagem geneticamente modificada BY4741 de *Saccharomyces cerevisiae*.

Tabela 12. Atividade estrogênica expressa através da média das unidades de fluorescência \pm desvio padrão e equivalentes de estradiol (EEq) para diferentes concentrações testadas da substância isolada 6-metoxiapigenina (**E.I. 4**) do extrato metanólico de *E. ligulatum*, além dos controles de toxicidade, negativo e positivo, na linhagem geneticamente modificada BY4741 de *S. cerevisiae*.

E.I. 4 (ug/orifício)	Média \pm DP	EEq (%)	EEq geral	
56,7	521 \pm 131	5	média fluorescência (5 concentrações) = C+ = EEq =	401 11422 4%
18,8	393 \pm 97	3		
6,3	355 \pm 79	3		
2,1	367 \pm 80	3		
0,7	367 \pm 82	3		
Controle de toxicidade	10470 \pm 2251	92		
MeOH	319 \pm 71	3		
Estradiol	11422 \pm 2532	100		

Controle de toxicidade: 2º maior concentração da substância + 50 μ L de Estradiol 10 nM/ orifício; **MeOH:** controle negativo - 5 μ L de metanol em 45 μ L de cultura com D.O. 0,1 a 600 nm; **Estradiol:** controle positivo – 17- β -Estradiol 10 nM.

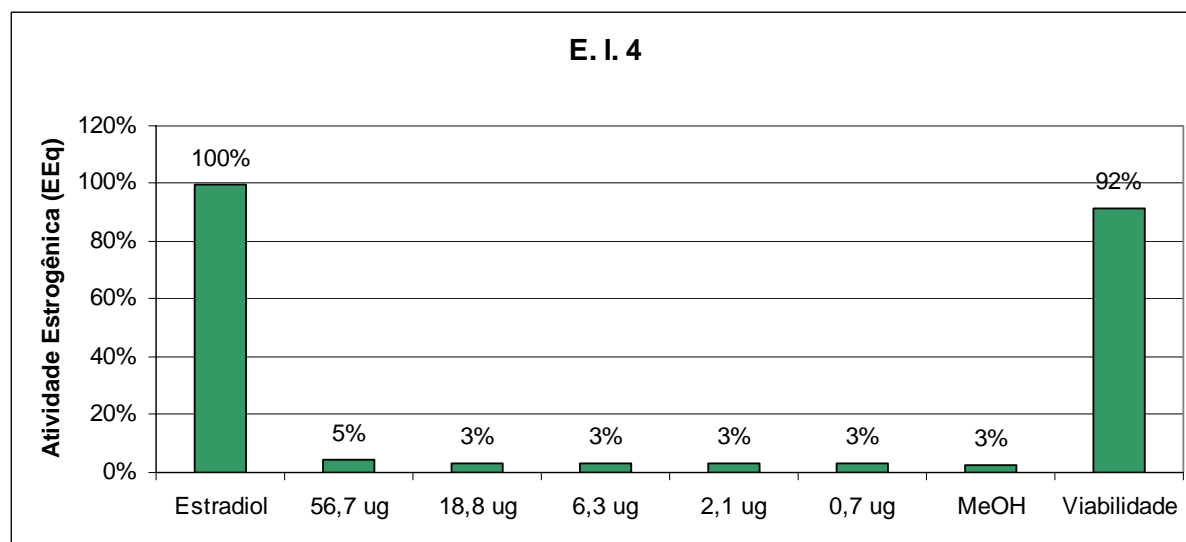


Figura 18. Atividade estrogênica expressa em Estradiol Equivalentes (EEq) para diferentes concentrações testadas da substância isolada **6-metoxiapigenina (E.I.4)** do extrato metanólico de *Eriocaulon ligulatum*, além dos controles de toxicidade, negativo e positivo, na linhagem geneticamente modificada BY4741 de *Saccharomyces cerevisiae*.

Tabela 13. Atividade estrogênica expressa através da média das unidades de fluorescência \pm desvio padrão e equivalentes de estradiol (EEq) para diferentes concentrações testadas da substância isolada Eriocaulina (**E.I. 5**) do extrato diclorometânico de *E. ligulatum*, além dos controles de toxicidade, negativo e positivo, na linhagem geneticamente modificada BY4741 de *S. cerevisiae*.

E.I. 5 (ug/orifício)	Média \pm DP	EEq (%)	EEq geral	
0,6	502 \pm 186	4	média fluorescência (5 concentrações) = C+ = EEq =	397 11364 3%
0,2	310 \pm 84	3		
0,07	430 \pm 170	4		
0,02	365 \pm 113	3		
0,007	378 \pm 137	3		
Controle de toxicidade	9816 \pm 3077	86		
DMSO	308 \pm 138	3		
Estradiol	11364 \pm 3740	100		

Controle de toxicidade: 2ª maior concentração da substância + 50 μ L de Estradiol 10 nM/ orifício; **DMSO:** controle negativo - 5 μ L de metanol em 45 μ L de cultura com D.O. 0,1 a 600 nm; **Estradiol:** controle positivo - 17- β -Estradiol 10 nM.

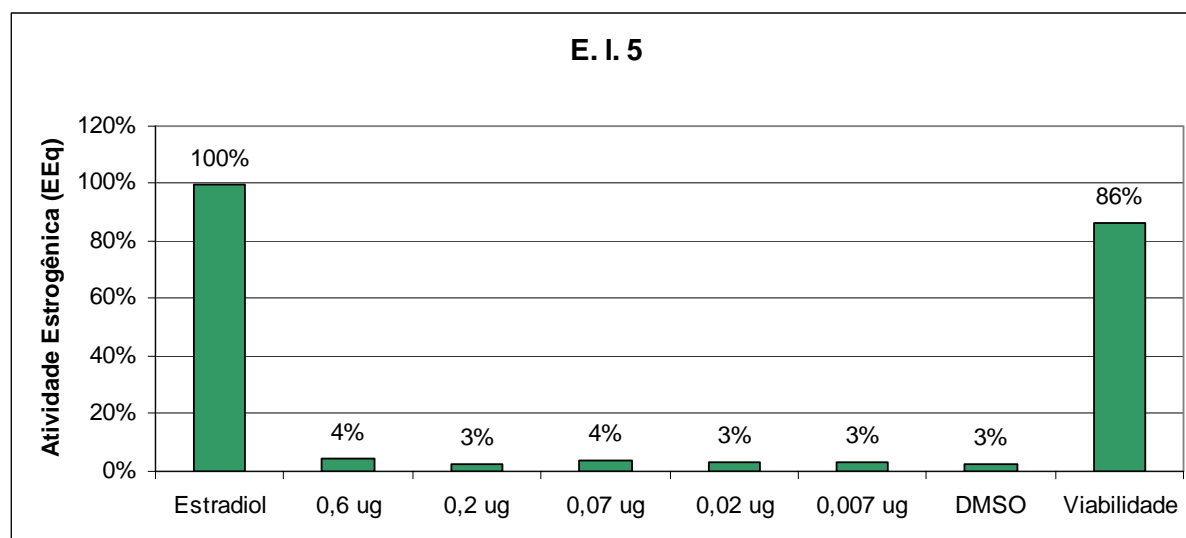


Figura 19. Atividade estrogênica expressa em Estradiol Equivalentes (EEq) para diferentes concentrações testadas da substância isolada **Eriocaulina (E.I. 5)** do extrato diclorometânico de *Eriocaulon ligulatum*, além dos controles de toxicidade, negativo e positivo, na linhagem geneticamente modificada BY4741 de *Saccharomyces cerevisiae*.

4. 1. 2. Teste RYA com extratos, frações enriquecidas e substâncias isoladas de *L. flavescens*

- **Extratos:**

O extrato metanólico de *L. flavescens* (**L.f. MeOH**) foi avaliado nas concentrações de 12,5; 4,2; 1,4; 0,5 e 0,15 µg/ orifício (Tabela 14) e o extrato diclorometânico de *L. flavescens* (**L.f. CH₂Cl₂**) foi avaliado nas concentrações de 27,0; 9,0; 3,0; 1,0 e 0,33 µg/ orifício (Tabela 15).

Os resultados da análise estatística da avaliação da estrogenicidade destes dois extratos demonstraram que esses podem ser considerados negativos para o teste RYA, pois nenhuma de suas concentrações testadas foi estatisticamente diferente do controle negativo e nem houve uma relação dose-resposta entre as doses testadas.

Os controles de toxicidade e positivos, de ambos os extratos, diferiram estatisticamente de todas as concentrações testadas e do controle negativo.

De acordo com as Tabelas 14 e 15, podemos verificar que os extratos metanólico e diclorometânico de *L. flavescens*, nas concentrações testadas, apresentaram, respectivamente uma viabilidade de 81% e 88% em relação ao controle positivo.

As Figuras 20 e 21 mostram as médias das unidades de fluorescência e a atividade estrogênica, expressa em estradiol equivalente (EEq), de cada uma das concentrações testadas dos extratos metanólico e diclorometânico de *L. flavescens*, dos seus controles de toxicidade, negativo e positivo.

Tabela 14. Atividade estrogênica expressa através da média das unidades de fluorescência \pm desvio padrão e equivalentes de estradiol (EEq) para diferentes concentrações testadas do extrato metanólico de *L. flavescens* (**L. f. MeOH**), além dos controles de toxicidade, negativo e positivo, na linhagem geneticamente modificada BY4741 de *S. cerevisiae*.

L. f. MeOH (ug/orifício)	Média \pm DP	EEq (%)	EEq geral	
12,5	400 \pm 54	2	média fluorescência (5 concentrações) =	561
4,2	531 \pm 78	3		
1,4	632 \pm 94	4		
0,5	651 \pm 67	4		
0,15	594 \pm 73	4		
Controle de toxicidade	13699 \pm 2319	81	C+ =	16832
MeOH	435 \pm 50	3	EEq =	3%
Estradiol	16832 \pm 2222	100		

Controle de toxicidade: 2º maior concentração do extrato + 50 μ L de Estradiol 10 nM/ orifício; **MeOH:** controle negativo - 5 μ L de metanol em 45 μ L de cultura com D.O. 0,1 a 600 nm; **Estradiol:** controle positivo – 17- β -Estradiol 10 nM.

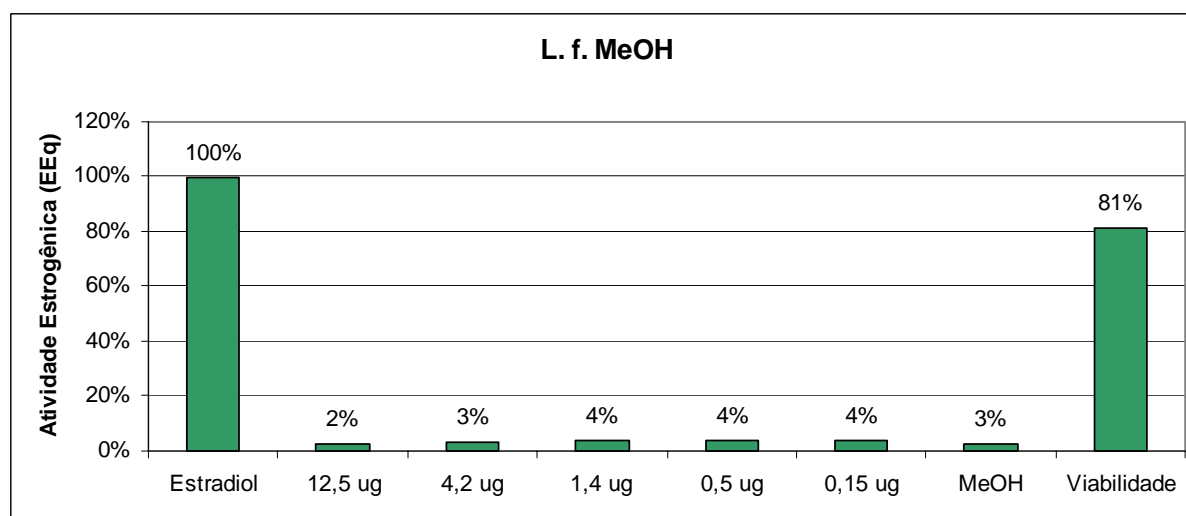


Figura 20. Atividade estrogênica expressa em Estradiol Equivalentes (EEq) para diferentes concentrações testadas **extrato metanólico de *Leiothrix flavescens* (L. f. MeOH)**, além dos controles de toxicidade, negativo e positivo, na linhagem geneticamente modificada BY4741 de *Saccharomyces cerevisiae*.

Tabela 15. Atividade estrogênica expressa através da média das unidades de fluorescência \pm desvio padrão e equivalentes de estradiol (EEq) para diferentes concentrações testadas do extrato diclorometânico de *L. flavescens* (**L. f. CH₂Cl₂**), além dos controles de toxicidade, negativo e positivo, na linhagem geneticamente modificada BY4741 de *S. cerevisiae*.

L. f. CH ₂ Cl ₂ (ug/orifício)	Média \pm DP	EEq (%)	EEq geral	
27,0	374 \pm 79	3	média fluorescência (5 concentrações) =	370
9,0	390 \pm 92	3		
3,0	362 \pm 84	3		
1,0	358 \pm 85	3		
0,33	367 \pm 82	3		
Controle de toxicidade	10082 \pm 2225	88	C+ =	11422
MeOH	319 \pm 71	3	EEq =	3%
Estradiol	11422 \pm 2532	100		

Controle de toxicidade: 2º maior concentração do extrato + 50 μ L de Estradiol 10 nM/ orifício; **MeOH:** controle negativo - 5 μ L de metanol em 45 μ L de cultura com D.O. 0,1 a 600 nm; **Estradiol:** controle positivo - 17- β -Estradiol 10 nM.

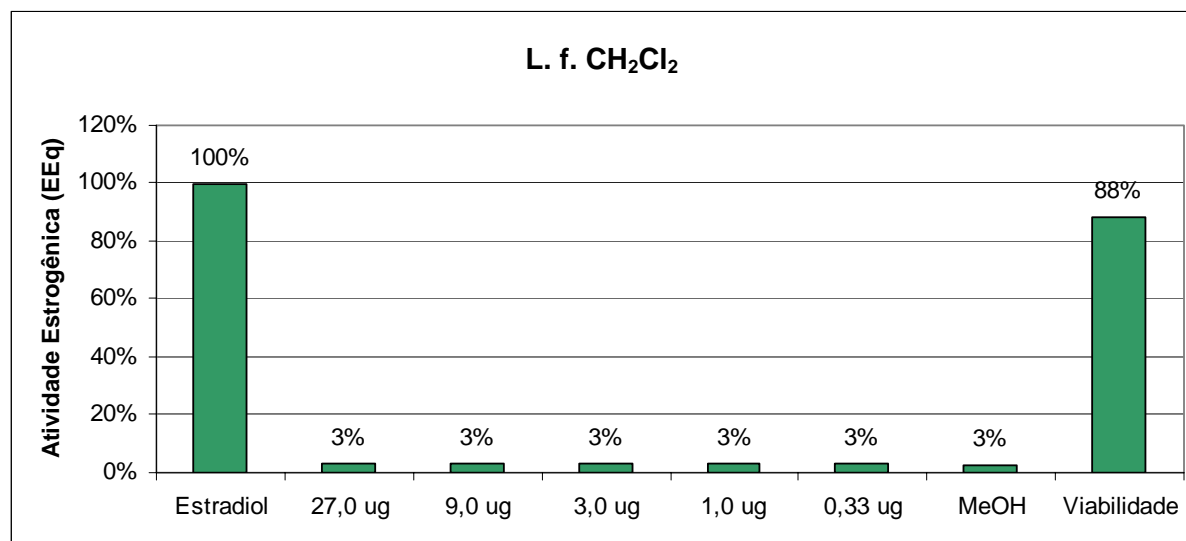


Figura 21. Atividade estrogênica expressa em Estradiol Equivalentes (EEq) para diferentes concentrações testadas do **extrato diclorometânico de *Leiothrix flavescens* (L. f. CH₂Cl₂)**, além dos controles de toxicidade, negativo e positivo, na linhagem geneticamente modificada BY4741 de *Saccharomyces cerevisiae*.

- **Frações:**

A fração 1 (**Fração 1 L.f.**), onde está presente a substância isolada 1,3-diferuloilglicerol (**L.f. 3**), foi avaliada nas concentrações de 126,0; 42,0; 14,0; 4,7 e 1,6 µg/orifício (Tabela 16); a fração de xantonas (**Fração 2 L.f.**) foi avaliada nas concentrações de 34,1; 11,4; 3,8; 1,3 e 0,4 µg/orifício (Tabela 17); a fração xantonas puras (**Fração 3 L.f.**) foi avaliada nas concentrações de 65,5; 21,8; 7,3; 2,4 e 0,8 µg/orifício (Tabela 18); a fração de flavonóides glicosilados (**Fração 4 L.f.**) foi avaliada nas concentrações de 11,1; 3,7; 1,2; 0,4 e 0,14 µg/orifício (Tabela 19) e a fração de flavonóides agliconas (**Fração 5 L.f.**) foi avaliada nas concentrações de 6,9; 2,3; 0,8; 0,26 e 0,08 µg/orifício (Tabela 20).

Os resultados da análise estatística da avaliação da estrogenicidade das cinco frações enriquecidas demonstraram que, as **Frações 1, 2 e 3 L.f.**, podem ser consideradas negativas para o teste RYA, pois nenhuma de suas concentrações testadas foi estatisticamente diferente do controle negativo e nem houve uma relação dose-resposta entre as doses testadas. Já as **Frações 4 e 5 L.f.** foram consideradas positivas para o teste RYA, pois pelo menos uma de suas concentrações foi estatisticamente diferente do controle negativo e houve uma relação dose-resposta entre as suas concentrações testadas.

A primeira (11,1 µg/orifício) e a segunda (3,7 µg/orifício) concentrações testadas da **Fração 4 L.f.** foram estatisticamente diferentes do controle negativo e houve uma relação dose-resposta observada entre a primeira e a terceira (1,3 µg/orifício) concentrações, entre a primeira e a quarta (0,4 µg/orifício), entre a primeira e a quinta (0,14 µg/orifício), entre a segunda e a terceira, entre a segunda e a quarta e entre a segunda e a quinta.

Para a **Fração 5 L.f.**, pudemos observar que foram a primeira (6,9 µg/orifício), a segunda (2,3 µg/orifício), a terceira (0,8 µg/orifício) e a quarta (0,26 µg/orifício) concentrações que diferiram estatisticamente do controle negativo. Houve também uma relação dose-resposta entre a primeira e segunda, entre a primeira e a terceira, entre a primeira

e a quinta (0,08 µg/ orifício); entre a segunda e a terceira, entre a segunda e a quarta, entre a segunda e a quinta; entre a terceira e a quarta, entre a terceira e a quinta; e entre a quarta e a quinta.

Os controles de toxicidade e positivos, para as **Frações 1, 2, 3, 4 e 5 L.f.**, diferiram estatisticamente de todas as concentrações testadas e do controle negativo.

De acordo com as Tabelas 16, 17, 18, 19 e 20, podemos verificar que as **Frações 1, 2, 3, 4 e 5 L.f.**, nas concentrações testadas, apresentaram, respectivamente uma viabilidade de 83%, 103%, 80%, 85% e 89% em relação ao controle positivo. Existe a possibilidade da presença de um interferente na amostra no caso da viabilidade estar acima de 100% e, nestes casos, a repetição do teste é indicada.

As Figuras 22 a 26 mostram as médias das unidades de fluorescência e a atividade estrogênica, expressa em estradiol equivalente (EEq), de cada uma das concentrações testadas das **Frações 1, 2, 3, 4 e 5 L.f.**, obtidas do extrato metanólico de *L. flavescens*, dos seus controles de toxicidade, negativo e positivo.

Tabela 16. Atividade estrogênica expressa através da média das unidades de fluorescência \pm desvio padrão e equivalentes de estradiol (EEq) para diferentes concentrações testadas da **Fração 1 L.f.** do extrato metanólico de *L. flavescens*, além dos controles de toxicidade, negativo e positivo, na linhagem geneticamente modificada BY4741 de *S. cerevisiae*.

Fração 1 L.f. (ug/orifício)	Média \pm DP	EEq (%)	EEq geral	
126,0	593 \pm 94	4	média fluorescência (5 concentrações) = C+ = EEq =	535 15761 3%
42,0	546 \pm 110	3		
14,0	482 \pm 93	3		
4,7	496 \pm 110	3		
1,6	558 \pm 132	4		
Controle de toxicidade	13148 \pm 2875	83		
MeOH	369 \pm 81	2		
Estradiol	15761 \pm 3370	100		

Controle de toxicidade: 2º maior concentração da fração + 50 μ L de Estradiol 10 nM/ orifício; **MeOH:** controle negativo - 5 μ L de metanol em 45 μ L de cultura com D.O. 0,1 a 600 nm; **Estradiol:** controle positivo - 17- β -Estradiol 10 nM.

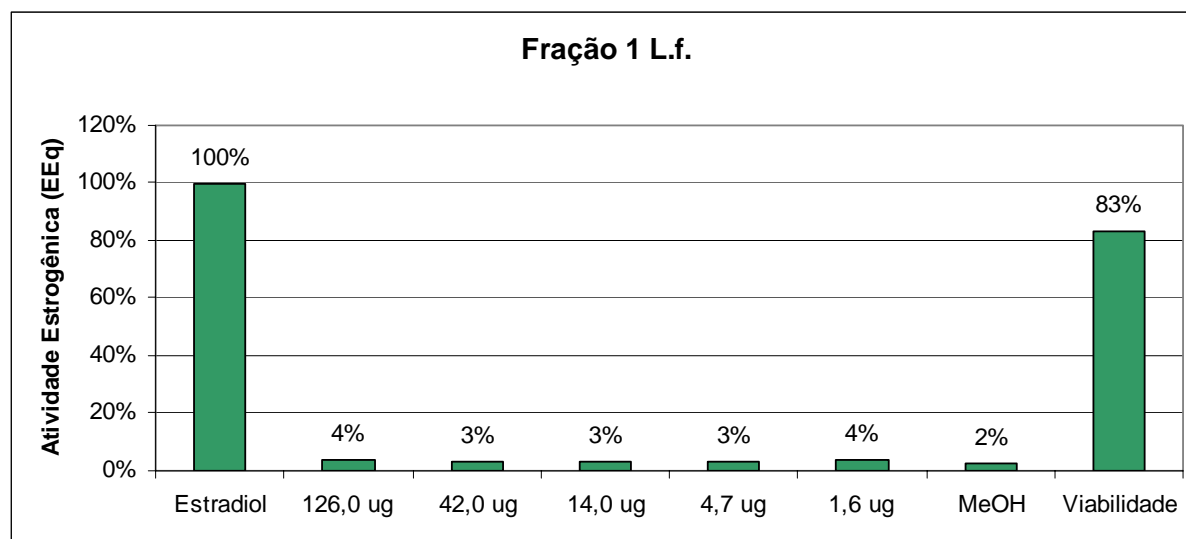


Figura 22. Atividade estrogênica expressa em Estradiol Equivalentes (EEq) para diferentes concentrações testadas da **Fração 1 L.f.** do extrato metanólico de *Leiothrix flavescens*, além dos controles de toxicidade, negativo e positivo, na linhagem geneticamente modificada BY4741 de *Saccharomyces cerevisiae*.

Tabela 17. Atividade estrogênica expressa através da média das unidades de fluorescência \pm desvio padrão e equivalentes de estradiol (EEq) para diferentes concentrações testadas da Fração de Xantonas (**Fração 2 L.f.**) do extrato metanólico de *L. flavescens*, além dos controles de toxicidade, negativo e positivo, na linhagem geneticamente modificada BY4741 de *S. cerevisiae*.

Fração 2 L.f. (ug/orifício)	Média \pm DP	EEq (%)	EEq geral	
34,1	151 \pm 5	1	média fluorescência (5 concentrações) =	246
11,4	191 \pm 8	2		
3,8	246 \pm 24	2		
1,9	289 \pm 50	3		
0,4	351 \pm 75	3		
Controle de toxicidade	11756 \pm 3435	103	C+ =	11422
MeOH	319 \pm 71	3	EEq =	2%
Estradiol	11422 \pm 2532	100		

Controle de toxicidade: 2º maior concentração da fração + 50 μ L de Estradiol 10 nM/ orifício; **MeOH:** controle negativo - 5 μ L de metanol em 45 μ L de cultura com D.O. 0,1 a 600 nm; **Estradiol:** controle positivo - 17- β -Estradiol 10 nM.

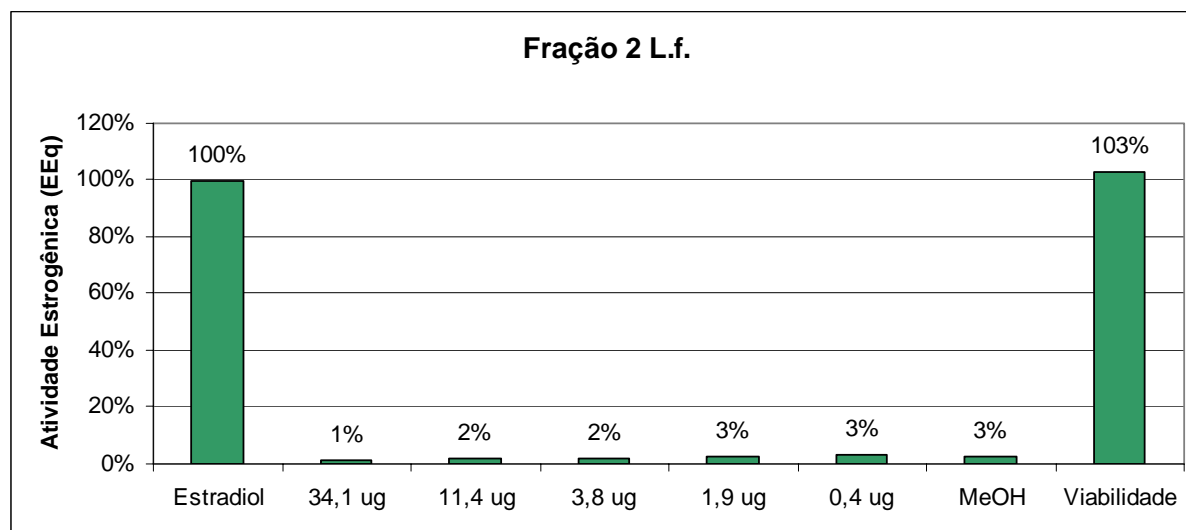


Figura 23. Atividade estrogênica expressa em Estradiol Equivalentes (EEq) para diferentes concentrações testadas da **Fração de Xantonas (Fração 2 L.f.)** do extrato metanólico de *Leiothrix flavescens*, além dos controles de toxicidade, negativo e positivo, na linhagem geneticamente modificada BY4741 de *Saccharomyces cerevisiae*.

Tabela 18. Atividade estrogênica expressa através da média das unidades de fluorescência \pm desvio padrão e equivalentes de estradiol (EEq) para diferentes concentrações testadas da Fração de Xantonas Puras (**Fração 3 L.f.**) do extrato metanólico de *L. flavescens*, além dos controles de toxicidade, negativo e positivo, na linhagem geneticamente modificada BY4741 de *S. cerevisiae*.

Fração 3 L.f. (ug/orifício)	Média \pm DP	EEq (%)	EEq geral	
65,5	414 \pm 103	2	média fluorescência (5 concentrações) =	533
21,8	490 \pm 124	3		
7,3	573 \pm 170	3		
2,4	616 \pm 194	4		
0,8	572 \pm 184	3		
Controle de toxicidade	13312 \pm 4677	80	C+ =	16633
MeOH	753 \pm 443	5	EEq =	3%
Estradiol	16633 \pm 4591	100		

Controle de toxicidade: 2º maior concentração da fração + 50 μ L de Estradiol 10 nM/ orifício; **MeOH:** controle negativo - 5 μ L de metanol em 45 μ L de cultura com D.O. 0,1 a 600 nm; **Estradiol:** controle positivo – 17- β -Estradiol 10 nM.

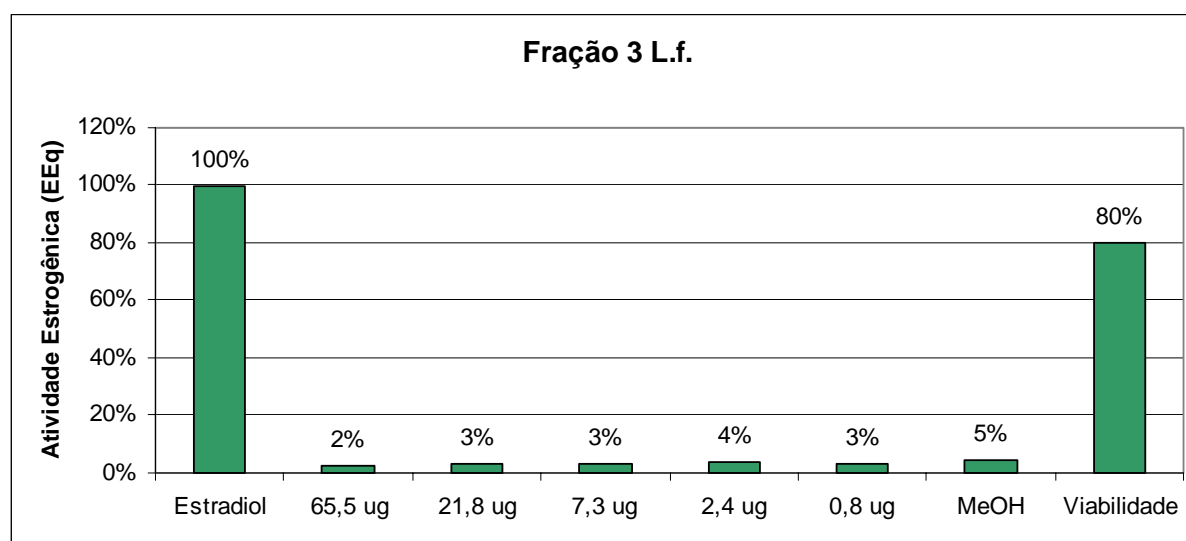


Figura 24. Atividade estrogênica expressa em Estradiol Equivalentes (EEq) para diferentes concentrações testadas da **Fração de Xantonas Puras (Fração 3 L.f.)** do extrato metanólico de *Leiothrix flavescens*, além dos controles de toxicidade, negativo e positivo, na linhagem geneticamente modificada BY4741 de *Saccharomyces cerevisiae*.

Tabela 19. Atividade estrogênica expressa através da média das unidades de fluorescência \pm desvio padrão e equivalentes de estradiol (EEq) para diferentes concentrações testadas da Fração de Flavonóides Glicosilados (**Fração 4 L.f.**) do extrato metanólico de *L. flavescens*, além dos controles de toxicidade, negativo e positivo, na linhagem geneticamente modificada BY4741 de *S. cerevisiae*.

Fração 4 L.f. (ug/ orifício)	Média \pm DP	EEq (%)	EEq geral	
11,1	2613 \pm 1085*	23	média fluorescência (5 concentrações) =	1294
3,7	2123 \pm 945*	19		
1,2	593 \pm 188	5		
0,4	543 \pm 171	5		
0,14	600 \pm 201	5		
Controle de toxicidade	9699 \pm 2443	85	C+ =	11422
MeOH	319 \pm 71	3	EEq =	11%
Estradiol	11422 \pm 2532	100		

Controle de toxicidade: 2º maior concentração da fração + 50 μ L de Estradiol 10 nM/ orifício; **MeOH:** controle negativo - 5 μ L de metanol em 45 μ L de cultura com D.O. 0,1 a 600 nm; **Estradiol:** controle positivo - 17- β -Estradiol 10 nM. * - Resultado estatisticamente significativo em relação ao controle negativo (P<0,05).

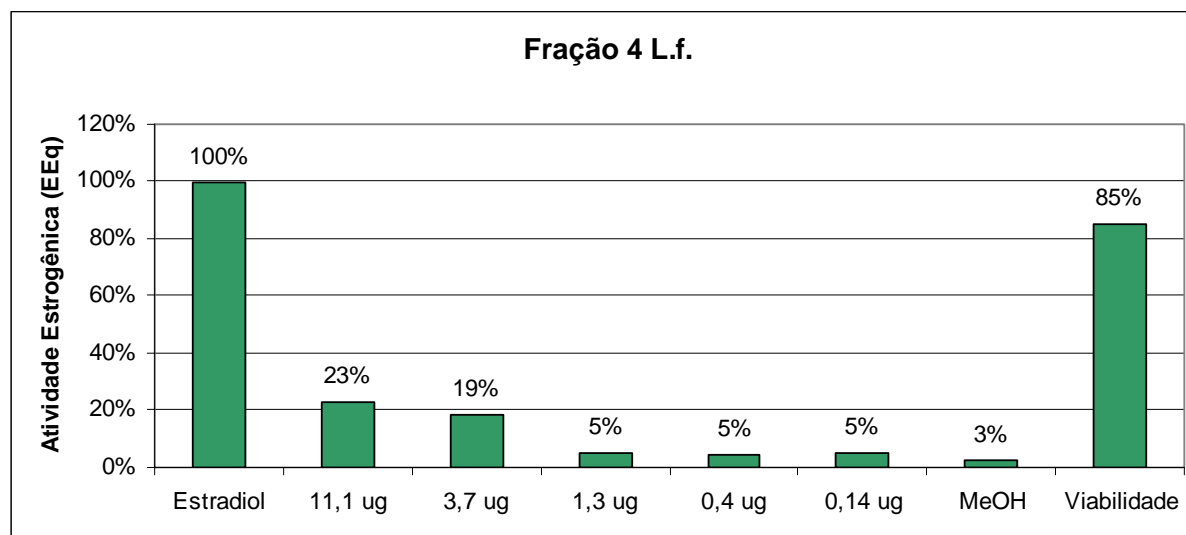


Figura 25. Atividade estrogênica expressa em Estradiol Equivalentes (EEq) para diferentes concentrações testadas da **Fração de Flavonóides Glicosilados (Fração 4 L.f.)** do extrato metanólico de *Leiothrix flavescens*, além dos controles de toxicidade, negativo e positivo, na linhagem geneticamente modificada BY4741 de *Saccharomyces cerevisiae*.

Tabela 20. Atividade estrogênica expressa através da média das unidades de fluorescência \pm desvio padrão e equivalentes de estradiol (EEq) para diferentes concentrações testadas da Fração de Flavonóides Agliconas (**Fração 5 L.f.**) do extrato metanólico de *L. flavescens*, além dos controles de toxicidade, negativo e positivo, na linhagem geneticamente modificada BY4741 de *S. cerevisiae*.

Fração 5 L.f. (ug/ orifício)	Média \pm DP	EEq (%)	EEq geral	
6,9	2449 \pm 705*	24	média fluorescência (5 concentrações) =	3909
2,3	6046 \pm 1565*	60		
0,8	8601 \pm 1968*	85		
0,26	2105 \pm 613*	21	C+ =	10137
0,08	346 \pm 88	3	EEq =	39%
Controle de toxicidade	8984 \pm 3485	89		
MeOH	244 \pm 51	2		
Estradiol	10137 \pm 2848	100		

Controle de toxicidade: 2º maior concentração da fração + 50 μ L de Estradiol 10 nM/ orifício; **MeOH:** controle negativo - 5 μ L de metanol em 45 μ L de cultura com D.O. 0,1 a 600 nm; **Estradiol:** controle positivo - 17- β -Estradiol 10 nM. * - Resultado estatisticamente significativo em relação ao controle negativo (P<0,05).

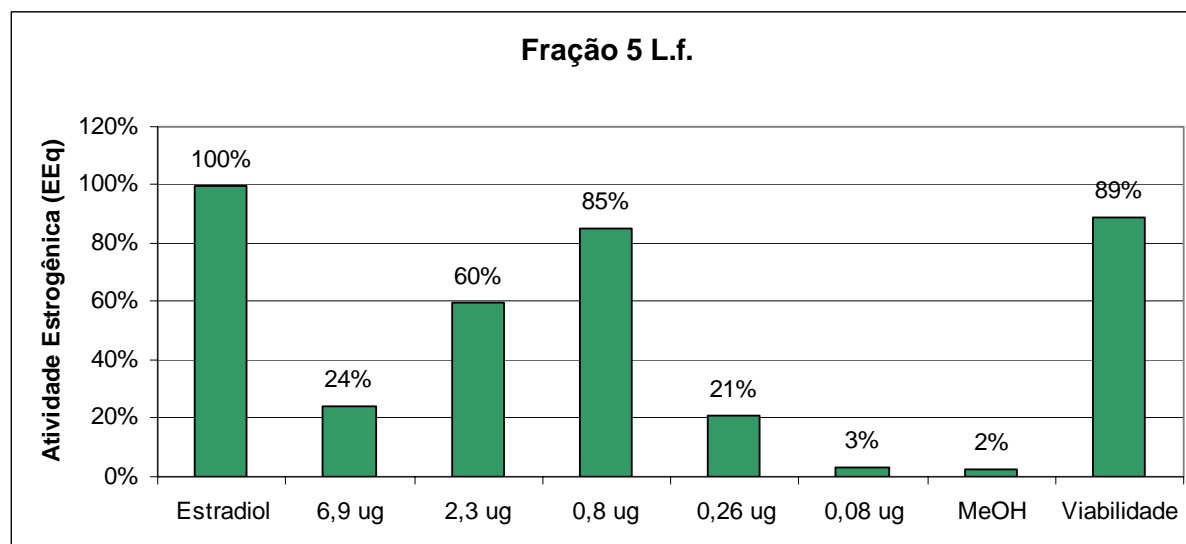


Figura 26. Atividade estrogênica expressa em Estradiol Equivalentes (EEq) para diferentes concentrações testadas da **Fração de Flavonóides Agliconas (Fração 5 L.f.)** do extrato metanólico de *Leiothrix flavescens*, além dos controles de toxicidade, negativo e positivo, na linhagem geneticamente modificada BY4741 de *Saccharomyces cerevisiae*.

- **Substâncias isoladas:**

A substância isolada luteolina (**L.f. 1**) foi avaliada nas concentrações de 1,4; 0,46; 0,15; 0,05 e 0,02 µg/ orifício (Tabela 21); a substância isolada 6-metoxiluteolina (**L.f. 2**) foi avaliada nas concentrações de 0,35; 0,12; 0,04; 0,013 e 0,004 µg/ orifício (Tabela 22) e a substância isolada 1,3-diferuloilglicerol (**L.f. 3**) foi avaliada nas concentrações de 1,8; 0,6; 0,2; 0,07 e 0,02 µg/ orifício (Tabela 23).

Os resultados da análise estatística da avaliação da estrogenicidade destas substâncias isoladas demonstraram que, das três, apenas a **L.f. 3** pode ser considerada negativa para o teste RYA, pois nenhuma de suas concentrações testadas foi estatisticamente diferente do controle negativo e nem houve uma relação dose-resposta entre as doses testadas. As substâncias **L.f. 1** e **L.f. 2** foram consideradas positivas para o teste RYA, pois pelo menos uma de suas concentrações foi diferente estatisticamente do controle negativo e houve uma relação dose-resposta entre as suas concentrações testadas.

A primeira (1,4 µg/ orifício), a segunda (0,46 µg/ orifício), a terceira (0,15 µg/ orifício), a quarta (0,05 µg/ orifício) e a quinta (0,02 µg/ orifício) concentrações testadas de **L.f. 1** foram estatisticamente diferentes do controle negativo e houve uma relação dose-resposta observada entre a primeira e a segunda, entre a primeira e a terceira, entre a primeira e a quarta, entre a primeira e a quinta; entre a segunda e a terceira, entre a segunda e a quinta; e entre a terceira e a quarta concentrações.

A primeira (0,35 µg/ orifício) e a segunda (0,12 µg/ orifício) concentrações testadas de **L.f. 2** foram estatisticamente diferentes do controle negativo e houve uma relação dose-resposta observada entre a primeira e a segunda, entre a primeira e a terceira (0,04 µg/ orifício), entre a primeira e a quarta (0,013 µg/ orifício), entre a primeira e a quinta (0,004 µg/ orifício), entre a segunda e a terceira, entre a segunda e a quarta, e entre a segunda e a quinta concentrações.

Os controles de toxicidade e positivos, de todas as substâncias isoladas, diferiram estatisticamente de todas as concentrações testadas e do controle negativo.

De acordo com as Tabelas 21, 22 e 23, podemos verificar que as substâncias isoladas **L.f. 1**, **L.f. 2** e **L.f. 3**, nas concentrações testadas, apresentaram, respectivamente uma viabilidade de 101%, 86% e 94% em relação ao controle positivo.

As Figuras 27 a 29 mostram as médias das unidades de fluorescência e a atividade estrogênica, expressa em estradiol equivalente (EEq), de cada uma das concentrações testadas das substâncias isoladas, **L.f. 1**, **L.f. 2** e **L.f. 3**, do extrato metanólico de *L. flavescens*, dos seus controles de toxicidade, negativo e positivo.

Tabela 21. Atividade estrogênica expressa através da média das unidades de fluorescência \pm desvio padrão e equivalentes de estradiol (EEq) para diferentes concentrações testadas da substância isolada luteolina (**L.f. 1**) do extrato metanólico de *L. flavescens*, além dos controles de toxicidade, negativo e positivo, na linhagem geneticamente modificada BY4741 de *S. cerevisiae*.

L.f. 1 (ug/orifício)	Média \pm DP	EEq (%)	EEq geral	
1,4	1660 \pm 556*	11	média fluorescência (5 concentrações) = C+ = EEq =	6223 15761 39%
0,46	6204 \pm 1730*	39		
0,15	8797 \pm 2082*	56		
0,05	6801 \pm 3611*	43		
0,02	7651 \pm 1512*	49		
Controle de toxicidade	15868 \pm 2154	101		
MeOH	369 \pm 81	2		
Estradiol	15761 \pm 3370	100		

Controle de toxicidade: 2º maior concentração da substância + 50 μ L de Estradiol 10 nM/ orifício; **MeOH:** controle negativo - 5 μ L de metanol em 45 μ L de cultura com D.O. 0,1 a 600 nm; **Estradiol:** controle positivo - 17- β -Estradiol 10 nM. * - Resultado estatisticamente significativo em relação ao controle negativo (P<0,05).

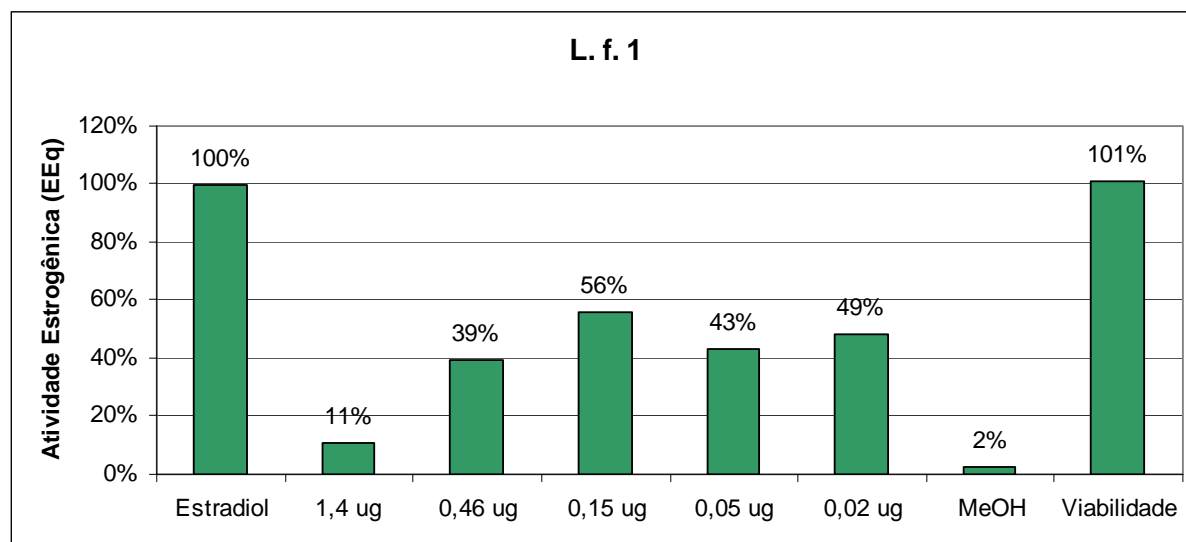


Figura 27. Atividade estrogênica expressa em Estradiol Equivalentes (EEq) para diferentes concentrações testadas da **substância isolada luteolina (L.f. 1)** do extrato metanólico de *Leiothrix flavescens*, além dos controles de toxicidade, negativo e positivo, na linhagem geneticamente modificada BY4741 de *Saccharomyces cerevisiae*.

Tabela 22. Atividade estrogênica expressa através da média das unidades de fluorescência \pm desvio padrão e equivalentes de estradiol (EEq) para diferentes concentrações testadas da substância isolada 6-metoxiluteolina (**L.f. 2**) do extrato metanólico de *L. flavescens*, além dos controles de toxicidade, negativo e positivo, na linhagem geneticamente modificada BY4741 de *S. cerevisiae*.

L.f. 2 (ug/orifício)	Média \pm DP	EEq (%)	EEq geral	
0,35	5363 \pm 1176*	34	média fluorescência (5 concentrações) = C+ = EEq =	1992 15761 13%
0,12	3425 \pm 832*	22		
0,04	468 \pm 124	3		
0,013	337 \pm 86	2		
0,004	368 \pm 85	2		
Controle de toxicidade	13486 \pm 2953	86		
MeOH	369 \pm 81	2		
Estradiol	15761 \pm 3370	100		

Controle de toxicidade: 2º maior concentração da substância + 50 μ L de Estradiol 10 nM/ orifício; **MeOH:** controle negativo - 5 μ L de metanol em 45 μ L de cultura com D.O. 0,1 a 600 nm; **Estradiol:** controle positivo - 17- β -Estradiol 10 nM. * - Resultado estatisticamente significativo em relação ao controle negativo (P<0,05).

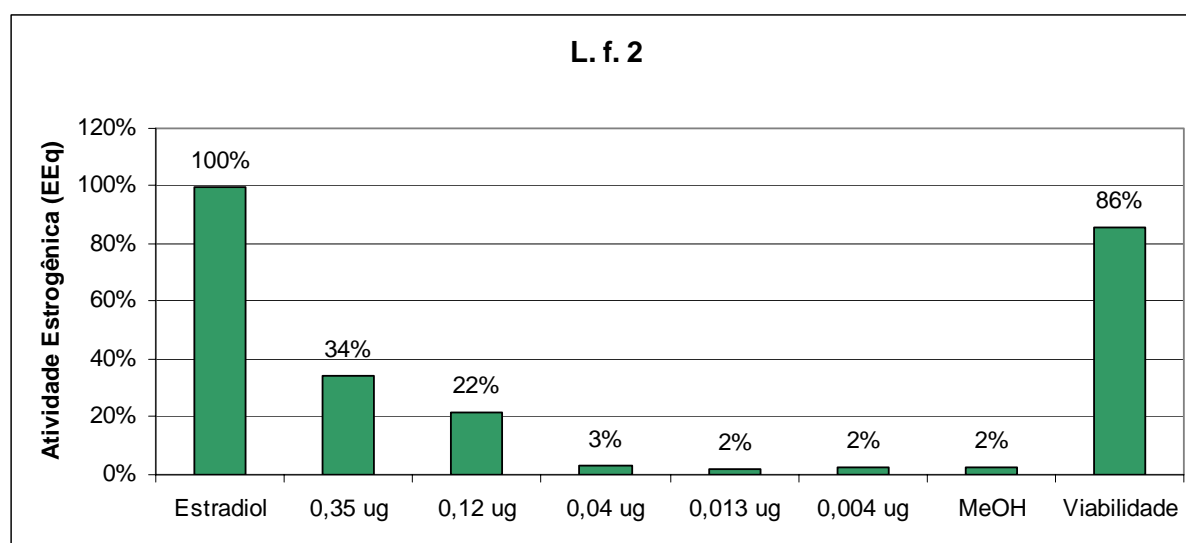


Figura 28. Atividade estrogênica expressa em Estradiol Equivalentes (EEq) para diferentes concentrações testadas da **substância isolada 6-metoxiluteolina (L.f. 2)** do extrato metanólico de *Leiothrix flavescens*, além dos controles de toxicidade, negativo e positivo, na linhagem geneticamente modificada BY4741 de *Saccharomyces cerevisiae*.

Tabela 23. Atividade estrogênica expressa através da média das unidades de fluorescência \pm desvio padrão e equivalentes de estradiol (EEq) para diferentes concentrações testadas da substância isolada 1,3-*O*-diferuloilglicerol (**L.f. 3**) do extrato metanólico de *L. flavescens*, além dos controles de toxicidade, negativo e positivo, na linhagem geneticamente modificada BY4741 de *S. cerevisiae*.

L.f. 3 (ug/orifício)	Média \pm DP	EEq (%)	EEq geral	
1,8	351 \pm 38	4	média fluorescência (5 concentrações) = C+ = EEq =	303 9197 3%
0,6	338 \pm 86	4		
0,2	307 \pm 55	3		
0,07	267 \pm 58	3		
0,02	253 \pm 68	3		
Controle de toxicidade	8666 \pm 1741	94		
MeOH	222 \pm 46	2		
Estradiol	9197 \pm 2610	100		

Controle de toxicidade: 2ª maior concentração da substância + 50 μ L de Estradiol 10 nM/ orifício; **MeOH:** controle negativo - 5 μ L de metanol em 45 μ L de cultura com D.O. 0,1 a 600 nm; **Estradiol:** controle positivo - 17- β -Estradiol 10 nM.

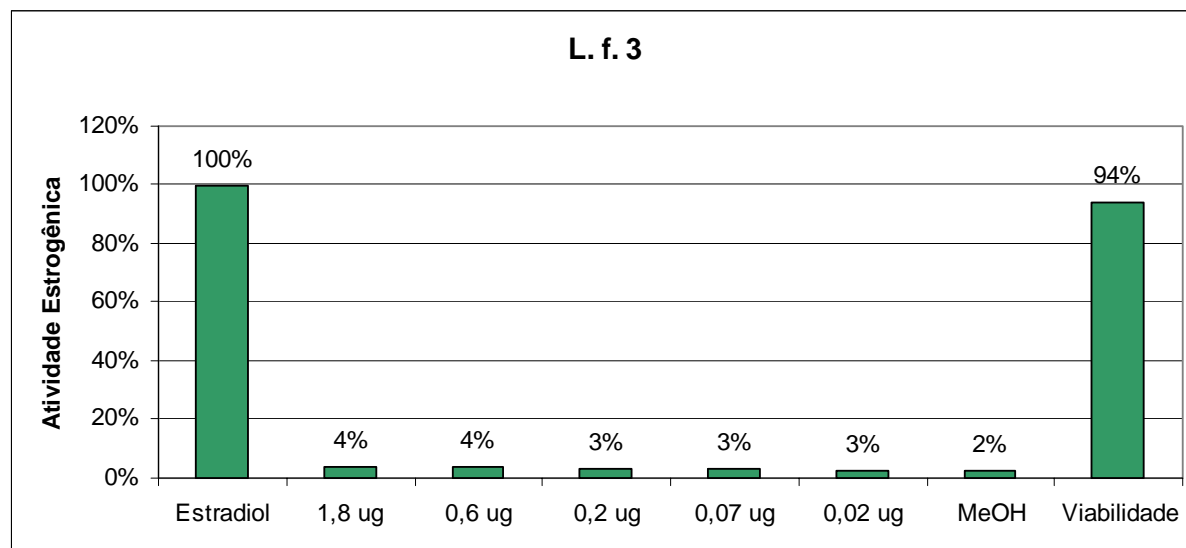


Figura 29. Atividade estrogênica expressa em Estradiol Equivalentes (EEq) para diferentes concentrações testadas da **substância isolada 1,3-*O*-diferuloilglicerol (L.f. 3)** do extrato metanólico de *Leiothrix flavescens*, além dos controles de toxicidade, negativo e positivo, na linhagem geneticamente modificada BY4741 de *Saccharomyces cerevisiae*.

4. 1. 3. Teste RYA com extratos de *L. spiralis*

O extrato metanólico de *L. spiralis* (**L.s. MeOH**) foi avaliado nas concentrações de 25,0; 8,3; 2,8; 0,9 e 0,3 µg/ orifício (Tabela 24) e o extrato diclorometânico de *L. spiralis* (**L.s. CH₂Cl₂**) foi avaliado nas concentrações de 1,5; 0,5; 0,17; 0,06 e 0,02 µg/ orifício (Tabela 25).

Os resultados da análise estatística da avaliação da estrogenicidade destes dois extratos demonstraram que esses podem ser considerados negativos para o teste RYA, pois nenhuma de suas concentrações testadas foi estatisticamente diferente do controle negativo e nem houve uma relação dose-resposta entre as doses testadas.

Os controles de toxicidade e positivos, de ambos os extratos, diferiram estatisticamente de todas as concentrações testadas e do controle negativo.

De acordo com as Tabelas 24 e 25, podemos verificar que os extratos metanólico e diclorometânico de *L. spiralis*, nas concentrações testadas, apresentaram, respectivamente uma viabilidade de 86% e 89% em relação ao controle positivo.

As Figuras 30 e 31 mostram as médias das unidades de fluorescência e a atividade estrogênica, expressa em estradiol equivalente (EEq), de cada uma das concentrações testadas dos extratos metanólico e diclorometânico de *L. spiralis*, dos seus controles de toxicidade, negativo e positivo.

Tabela 24. Atividade estrogênica expressa através da média das unidades de fluorescência \pm desvio padrão e equivalentes de estradiol (EEq) para diferentes concentrações testadas do extrato metanólico de *L. spiralis* (**L.s. MeOH**), além dos controles de toxicidade, negativo e positivo, na linhagem geneticamente modificada BY4741 de *S. cerevisiae*.

L.s. MeOH (ug/orifício)	Média \pm DP	EEq (%)	EEq geral	
25,0	457 \pm 30	4	média fluorescência (5 concentrações) =	437
8,3	448 \pm 40	4		
2,8	431 \pm 45	3		
0,9	431 \pm 56	3		
0,3	421 \pm 34	3		
Controle de toxicidade	10706 \pm 2533	86	C+ =	12418
MeOH	350 \pm 65	3	EEq =	4%
Estradiol	12418 \pm 1603	100		

Controle de toxicidade: 2º maior concentração do extrato + 50 μ L de Estradiol 10 nM/ orifício”; **MeOH:** controle negativo - 5 μ L de metanol em 45 μ L de cultura com D.O. 0,1 a 600 nm; **Estradiol:** controle positivo – 17- β -Estradiol 10 nM.

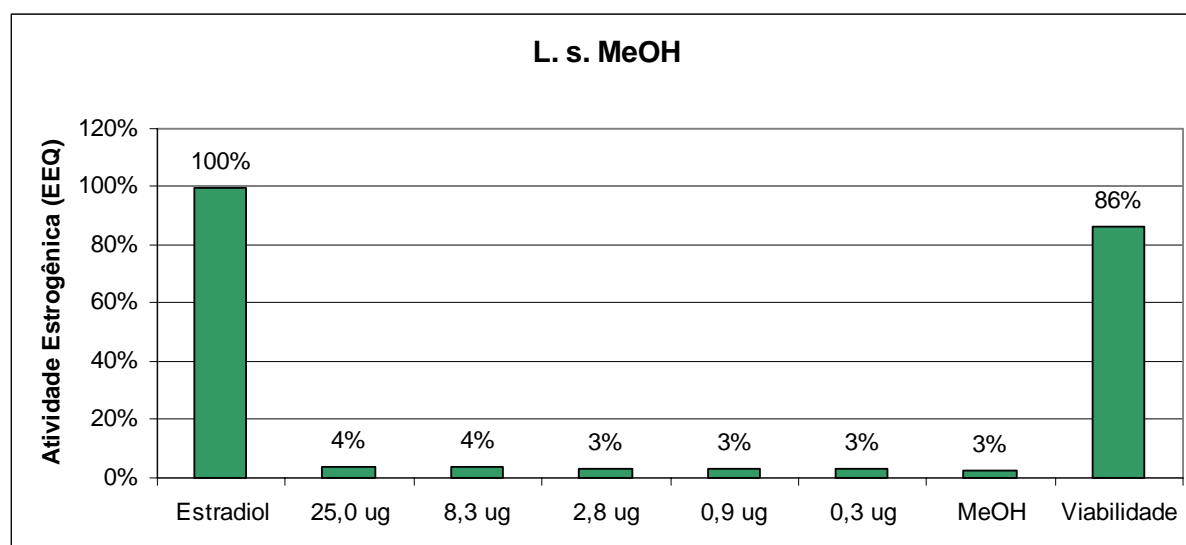


Figura 30. Atividade estrogênica expressa em Estradiol Equivalentes (EEq) para diferentes concentrações testadas do extrato metanólico de *Leiothrix spiralis* (**L. s. MeOH**), além dos controles de toxicidade, negativo e positivo, na linhagem geneticamente modificada BY4741 de *Saccharomyces cerevisiae*.

Tabela 25. Atividade estrogênica expressa através da média das unidades de fluorescência \pm desvio padrão e equivalentes de estradiol (EEq) para diferentes concentrações testadas do extrato diclorometânico de *L. spiralis* (**L.s. CH₂Cl₂**), além dos controles de toxicidade, negativo e positivo, na linhagem geneticamente modificada BY4741 de *S. cerevisiae*.

L.s. CH ₂ Cl ₂ (ug/orifício)	Média \pm DP	EEq (%)	EEq geral	
1,5	241 \pm 26	4	média fluorescência (5 concentrações) = C+ = EEq =	231 5581 4%
0,5	234 \pm 39	4		
0,17	230 \pm 29	4		
0,06	213 \pm 27	4		
0,02	236 \pm 35	4		
Controle de toxicidade	4951 \pm 894	89		
MeOH	226 \pm 32	4		
Estradiol	5581 \pm 1379	100		

Controle de toxicidade: 2º maior concentração do extrato + 50 μ L de Estradiol 10 nM/ orifício; **MeOH:** controle negativo - 5 μ L de metanol em 45 μ L de cultura com D.O. 0,1 a 600 nm; **Estradiol:** controle positivo – 17- β -Estradiol 10 nM.

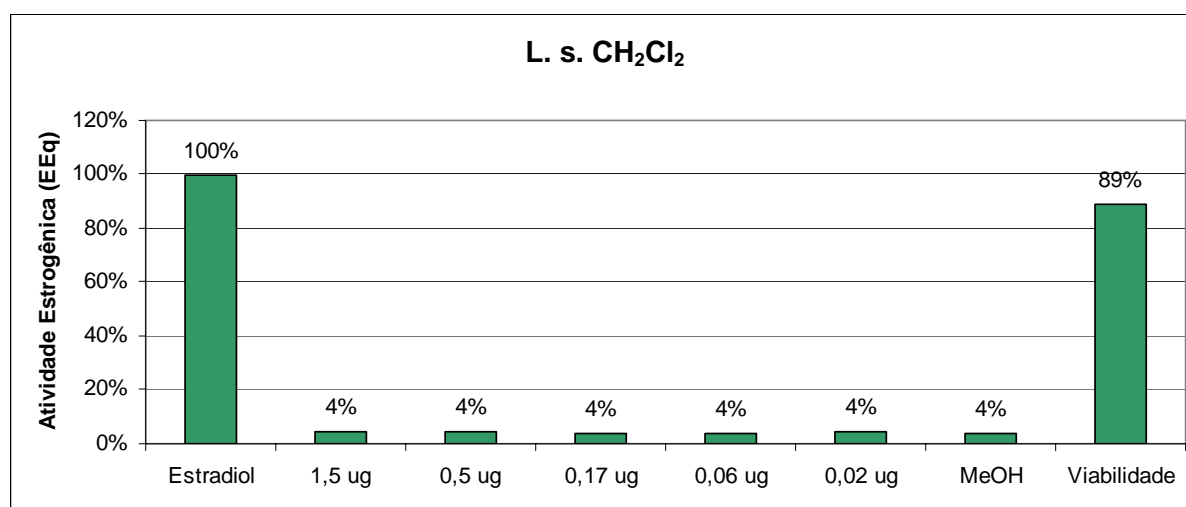


Figura 31. Atividade estrogênica expressa em Estradiol Equivalentes (EEq) para diferentes concentrações testadas do **extrato diclorometânico de *Leiothrix spiralis* (L. s. CH₂Cl₂)**, além dos controles de toxicidade, negativo e positivo, na linhagem geneticamente modificada BY4741 de *Saccharomyces cerevisiae*.

4. 1. 4. Teste RYA com as isocumarinas isoladas de outras plantas da família Eriocaulaceae

4. 1. 4. 1. Teste RYA com a paepalantina isolada de *P. vellozioides*

A paepalantina foi avaliada nas concentrações de 0,016; 0,005; 0,002; 0,0007 e 0,0002 µg/ orifícios.

Os resultados da análise estatística da avaliação da estrogenicidade da isocumarina paepalantina aglicona demonstraram que essa pode ser considerada negativa para o teste RYA, pois nenhuma de suas concentrações testadas foi estatisticamente diferente do controle negativo e nem houve uma relação dose-resposta entre as doses testadas. Os seus controles de toxicidade e positivos diferiram estatisticamente de todas as concentrações testadas e do controle negativo.

De acordo com a Tabela 26 e com a Figura 32, podemos verificar que a paepalantina, nas concentrações testadas, apresentou uma viabilidade de 90% em relação ao controle positivo.

Tabela 26. Atividade estrogênica expressa através da média das unidades de fluorescência \pm desvio padrão e equivalentes de estradiol (EEq) para diferentes concentrações testadas da isocumarina **paepalantina** isolada do extrato metanólico de *P. vellozioides*, além dos controles de toxicidade, negativo e positivo, na linhagem geneticamente modificada BY4741 de *S. cerevisiae*.

Paepalantina (ug/ orifício)	Média \pm DP	EEq (%)	EEq geral	
0,016	434 \pm 62	3	média fluorescência (5 concentrações) = C+ = EEq =	432 12418 3%
0,005	420 \pm 37	3		
0,002	483 \pm 57	4		
0,0007	415 \pm 39	3		
0,0002	407 \pm 40	3		
Controle de toxicidade	11203 \pm 1565	90		
DMSO	350 \pm 65	3		
Estradiol	12418 \pm 1603	100		

Controle de toxicidade: 2º maior concentração da substância + 50 μ L de Estradiol 10 nM/ orifício; **DMSO:** controle negativo - 5 μ L de metanol em 45 μ L de cultura com D.O. 0,1 a 600 nm; **Estradiol:** controle positivo - 17- β -Estradiol 10 nM.

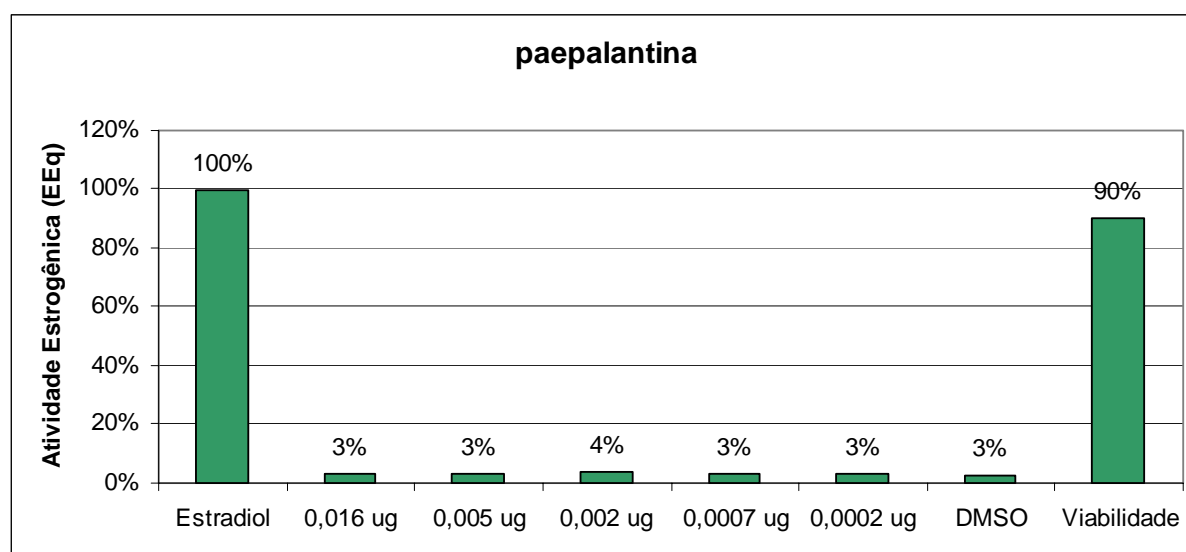


Figura 32. Atividade estrogênica expressa em Estradiol Equivalentes (EEq) para diferentes concentrações testadas da isocumarina **paepalantina** isolada do extrato metanólico de *Paepalanthus vellozioides*, além dos controles de toxicidade, negativo e positivo, na linhagem geneticamente modificada BY4741 de *Saccharomyces cerevisiae*.

4. 1. 4. 2. Teste RYA com o dímero 8-8' da paepalantina e com as paepalantinas mono e diheterosídicas isoladas de *P. bromelioides*

O dímero 8-8' da paepalantina foi avaliado nas concentrações de 0,14; 0,05; 0,015; 0,005 e 0,002 µg/ orifício (Tabela 27). A paepalantina monoheterosídica foi avaliada nas concentrações de 10,8; 3,6; 1,2; 0,4 e 0,13 µg/ orifício (Tabela 28). A paepalantina diheterosídica foi avaliada nas concentrações de 4,52; 1,51; 0,5; 0,17 e 0,06 µg/ orifício (Tabela 29).

Os resultados da análise estatística da avaliação da estrogenicidade do dímero 8-8' da paepalantina e das paepalantinas mono e diheterosídicas demonstraram que apenas a paepalantina monoheterosídica pode ser considerada positiva para o teste RYA, pois pelo menos uma de suas concentrações testadas foi estatisticamente diferente do controle negativo e houve uma relação dose-resposta entre as doses testadas.

Para a paepalantina monoheterosídica, pudemos observar que a primeira (10,8 µg/ orifício) e a segunda (3,6 µg/ orifício) concentrações testadas foram estatisticamente diferentes do controle negativo e houve uma relação dose-resposta observada entre a primeira e todas as demais concentrações testadas, entre a segunda e a quarta (0,4 µg/ orifício), e entre a segunda e a quinta (0,13 µg/ orifício) concentrações.

Os seus controles de toxicidade e positivos diferiram estatisticamente de todas as concentrações testadas e do controle negativo.

De acordo com a Tabela 27, 28 e 29 e com as Figuras 33 a 35, podemos verificar que o dímero 8-8' da paepalantina, as paepalantinas mono e diheterosídicas, nas concentrações testadas, apresentaram, respectivamente, uma viabilidade de 80%, 93% e 91% em relação ao controle positivo.

Tabela 27. Atividade estrogênica expressa através da média das unidades de fluorescência \pm desvio padrão e equivalentes de estradiol (EEq) para diferentes concentrações testadas do **dímero 8-8'** da isocumarina paepalantina isolado do extrato metanólico de *P. bromelioides*, além dos controles de toxicidade, negativo e positivo, na linhagem geneticamente modificada BY4741 de *S. cerevisiae*.

Dímero 8-8' (ug/ orifício)	Média \pm DP	EEq (%)	EEq geral	
0,14	721 \pm 63	7	média fluorescência (5 concentrações) = C+ = EEq =	411 10137 4%
0,05	432 \pm 68	4		
0,015	308 \pm 59	3		
0,005	307 \pm 75	3		
0,002	286 \pm 70	3		
Controle de toxicidade	8111 \pm 2791	80		
MeOH	244 \pm 51	2		
Estradiol	10137 \pm 2848	100		

Controle de toxicidade: 2º maior concentração da substância + 50 μ L de Estradiol 10 nM/ orifício; **MeOH:** controle negativo - 5 μ L de metanol em 45 μ L de cultura com D.O. 0,1 a 600 nm; **Estradiol:** controle positivo - 17- β -Estradiol 10 nM.

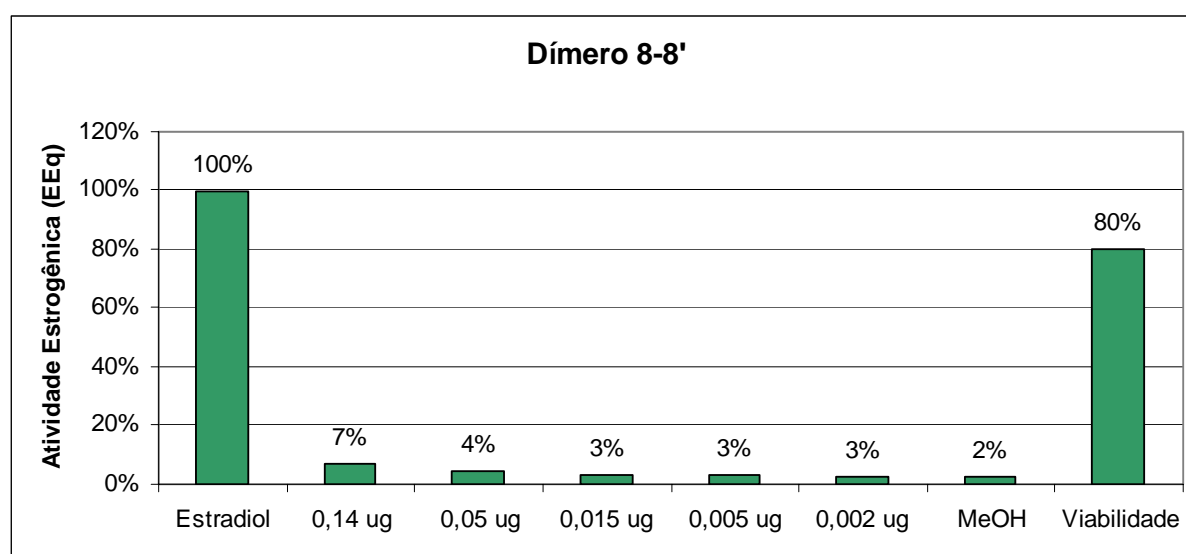


Figura 33. Atividade estrogênica expressa em Estradiol Equivalentes (EEq) para diferentes concentrações testadas do **dímero 8-8'** da isocumarina paepalantina isolado do extrato metanólico de *Paepalanthus bromelioides*, além dos controles de toxicidade, negativo e positivo, na linhagem geneticamente modificada BY4741 de *Saccharomyces cerevisiae*

Tabela 28. Atividade estrogênica expressa através da média das unidades de fluorescência \pm desvio padrão e equivalentes de estradiol (EEq) para diferentes concentrações testadas da isocumarina **paepalantina monoheterosídica** isolada do extrato metanólico de *P. bromelioides*, além dos controles de toxicidade, negativo e positivo, na linhagem geneticamente modificada BY4741 de *S. cerevisiae*.

Paepalantina monoheterosídica (ug/ orifício)	Média \pm DP	EEq (%)	EEq geral	
10,8	2819 \pm 125*	43	média fluorescência (5 concentrações) =	1133
3,6	1286 \pm 108*	20		
1,2	749 \pm 75	12		
0,04	441 \pm 53	7		
0,13	368 \pm 61	6		
Controle de toxicidade	6072 \pm 1458	93	C+ =	6496
MeOH	303 \pm 59	5	EEq =	17%
Estradiol	6496 \pm 2187	100		

Controle de toxicidade: 2º maior concentração da substância + 50 μ L de Estradiol 10 nM/ orifício; **MeOH:** controle negativo - 5 μ L de metanol em 45 μ L de cultura com D.O. 0,1 a 600 nm; **Estradiol:** controle positivo - 17- β -Estradiol 10 nM. * - Resultado estatisticamente significativo em relação ao controle negativo (P<0,05).

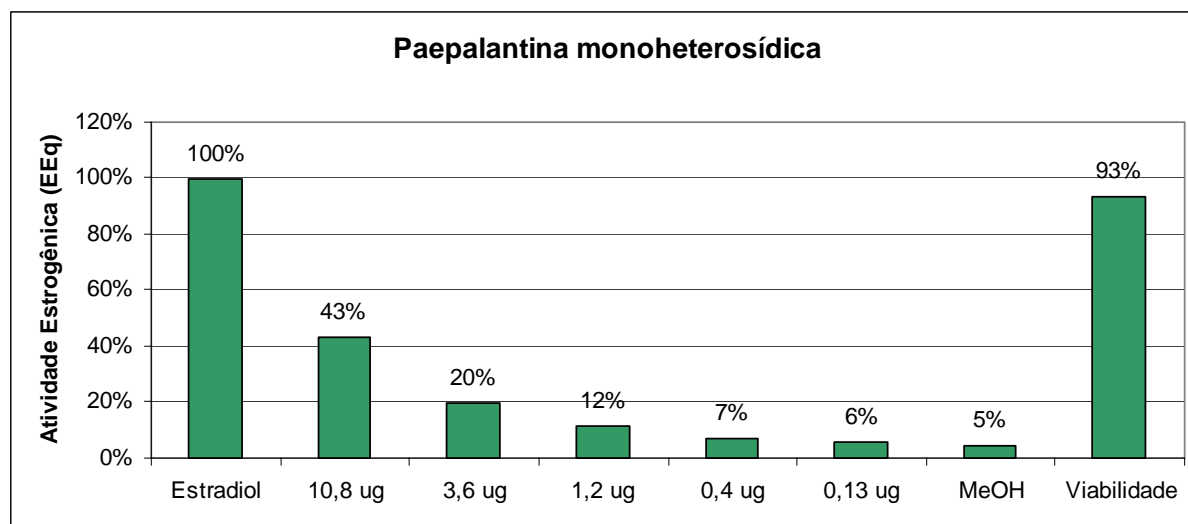


Figura 34. Atividade estrogênica expressa em Estradiol Equivalentes (EEq) para diferentes concentrações testadas da isocumarina **paepalantina monoheterosídica** isolada do extrato metanólico de *Paepalanthus bromelioides*, além dos controles de toxicidade, negativo e positivo, na linhagem geneticamente modificada BY4741 de *Saccharomyces cerevisiae*.

Tabela 29. Atividade estrogênica expressa através da média das unidades de fluorescência \pm desvio padrão e equivalentes de estradiol (EEq) para diferentes concentrações testadas da isocumarina **paepalantina diheterosídica** isolada do extrato metanólico de *P. bromelioides*, além dos controles de toxicidade, negativo e positivo, na linhagem geneticamente modificada BY4741 de *S. cerevisiae*.

Paepalantina diheterosídica (ug/ orifício)	Média \pm DP	EEq (%)	EEq geral	
4,52	1202 \pm 196	16	média fluorescência (5 concentrações) =	587
1,51	666 \pm 104	9		
0,5	424 \pm 94	6		
0,17	341 \pm 61	5		
0,06	304 \pm 48	4		
Controle de toxicidade	6741 \pm 1802	91	C+ =	7437
MeOH	208 \pm 34	3	EEq =	8%
Estradiol	7437 \pm 1773	100		

Controle de toxicidade: 2º maior concentração da substância + 50 μ L de Estradiol 10 nM/ orifício; **MeOH:** controle negativo - 5 μ L de metanol em 45 μ L de cultura com D.O. 0,1 a 600 nm; **Estradiol:** controle positivo - 17- β -Estradiol 10 nM. * - Resultado estatisticamente significativo em relação ao controle negativo (P<0,05).

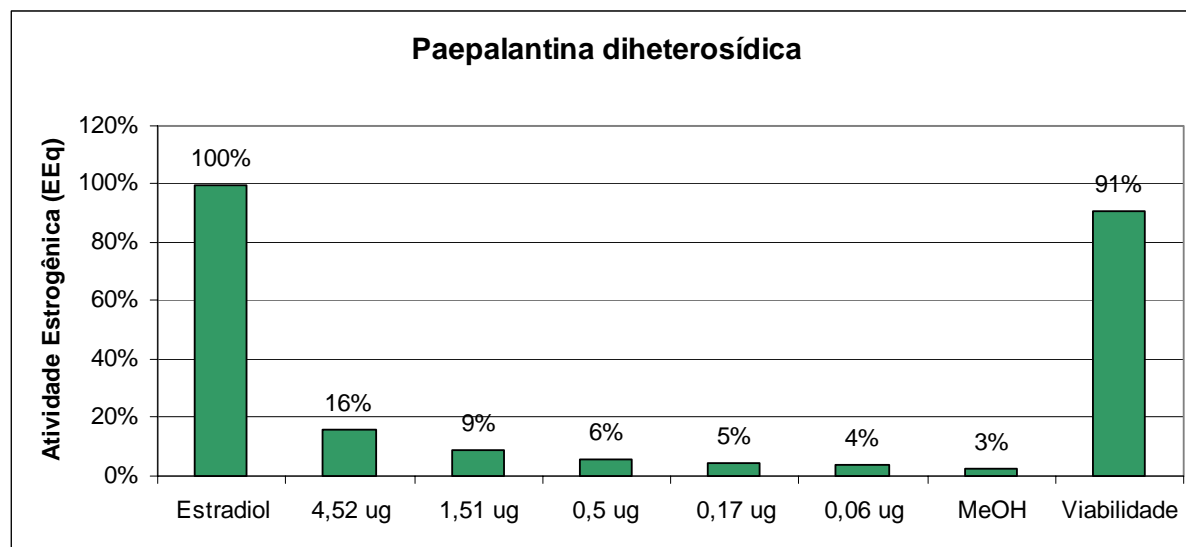


Figura 35. Atividade estrogênica expressa em Estradiol Equivalentes (EEq) para diferentes concentrações testadas da isocumarina **paepalantina diheterosídica** isolada do extrato metanólico de *Paepalanthus bromelioides*, além dos controles de toxicidade, negativo e positivo, na linhagem geneticamente modificada BY4741 de *Saccharomyces cerevisiae*.

4. 1. 4. 3. Teste RYA com a planifolina isolada de *P. planifolius*

A planifolina foi avaliada nas concentrações de 10,9; 3,7; 1,2; 0,4 e 0,14 µg/ orifício. Os resultados da análise estatística da avaliação da estrogénicidade da planifolina demonstraram que essa pode ser considerada positiva para o teste RYA, pois sua primeira concentração (10,9 µg/ orifício) foi estatisticamente diferente do controle negativo.

Os seus controles de toxicidade e positivos diferiram estatisticamente de todas as concentrações testadas e do controle negativo.

De acordo com a Tabela 30 e com a Figura 36, podemos verificar que a planifolina, nas concentrações testadas, apresentou uma viabilidade de 84% em relação ao controle positivo.

Tabela 30. Atividade estrogênica expressa através da média das unidades de fluorescência \pm desvio padrão e equivalentes de estradiol (EEq) para diferentes concentrações testadas da isocumarina **planifolina** isolada do extrato metanólico de *P. planifolius*, além dos controles de toxicidade, negativo e positivo, na linhagem geneticamente modificada BY4741 de *S. cerevisiae*.

Planifolina (ug/ orifício)	Média \pm DP	EEq (%)	EEq geral	
10,9	767 \pm 71*	10	média fluorescência (5 concentrações) =	407
3,7	405 \pm 38	5		
1,2	321 \pm 46	4		
0,4	268 \pm 39	4		
0,14	273 \pm 49	4		
Controle de toxicidade	6256 \pm 1524	84	C+ =	7437
MeOH	208 \pm 34	3	EEq =	5%
Estradiol	7437 \pm 1773	100		

Controle de toxicidade: 2º maior concentração da substância + 50 μ L de Estradiol 10 nM/ orifício; **MeOH:** controle negativo - 5 μ L de metanol em 45 μ L de cultura com D.O. 0,1 a 600 nm; **Estradiol:** controle positivo – 17- β -Estradiol 10 nM.

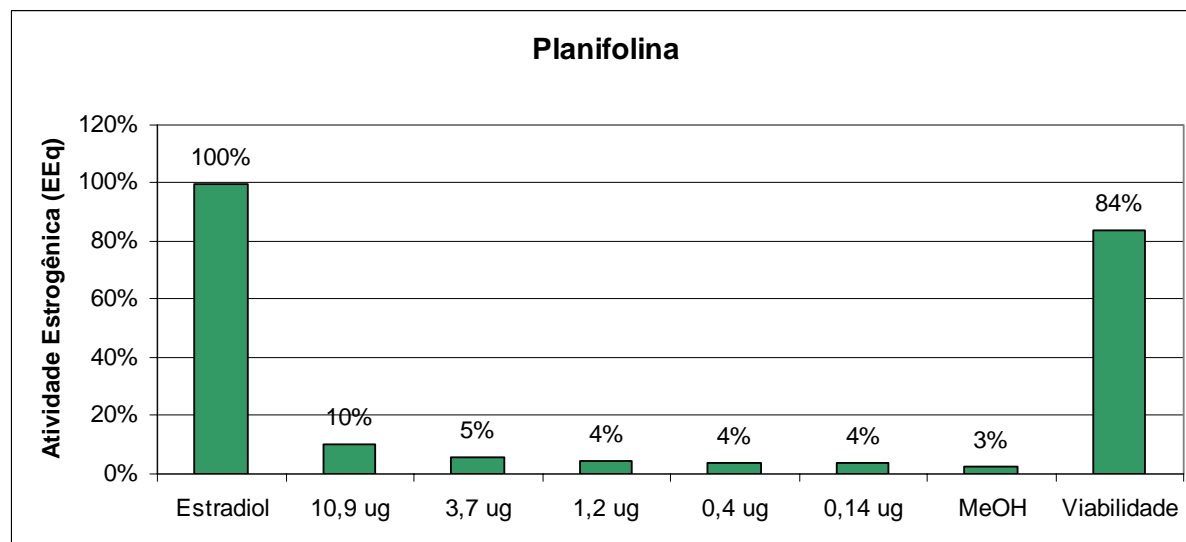


Figura 36. Atividade estrogênica expressa em Estradiol Equivalentes (EEq) para diferentes concentrações testadas da isocumarina **planifolina** isolada do extrato metanólico de *Paepalanthus planifolius*, além dos controles de toxicidade, negativo e positivo, na linhagem geneticamente modificada BY4741 de *Saccharomyces cerevisiae*.

4. 1. 4. 4. Teste RYA com as paepalantinas acetiladas

A paepalantina acetilada na posição 5 foi avaliada nas concentrações de 10,3; 3,4; 1,15; 0,38 e 0,13 $\mu\text{g/}$ orifício (Tabela 31). A paepalantina acetilada na posição 6 foi avaliada nas concentrações de 21,8; 7,3; 2,4; 0,8 e 0,3 $\mu\text{g/}$ orifício (Tabela 32). A paepalantina acetilada na posição 7 foi avaliada nas concentrações de 61,5; 20,5; 6,8; 2,3 e 0,76 $\mu\text{g/}$ orifício (Tabela 33).

Os resultados da análise estatística da avaliação da estrogenicidade das paepalantinas acetiladas nas posições 5, 6 e 7 demonstraram que essas podem ser consideradas positivas para o teste RYA, pois pelo menos uma de suas concentrações testadas foi estatisticamente diferente do controle negativo e houve uma relação dose-resposta entre as doses testadas.

Para a paepalantina acetilada na posição 5 pudemos observar que somente a primeira (10,3 $\mu\text{g/}$ orifício), a segunda (3,4 $\mu\text{g/}$ orifício) e a terceira (1,15 $\mu\text{g/}$ orifício) concentrações testadas foram estatisticamente diferentes do controle negativo e houve uma relação dose-resposta observada entre a primeira e a segunda, entre a primeira e a terceira, entre a primeira e a quarta (0,38 $\mu\text{g/}$ orifício) e entre a primeira e a quinta (0,13 $\mu\text{g/}$ orifício) concentrações; entre a segunda e a terceira, entre a segunda e a quarta e entre a segunda e a quinta concentrações.

Para a paepalantina acetilada na posição 6 pudemos observar que somente a primeira (21,8 $\mu\text{g/}$ orifício) concentração testada foi estatisticamente diferente do controle negativo e houve uma relação dose-resposta observada entre a primeira e a terceira (2,4 $\mu\text{g/}$ orifício), entre a primeira e a quarta (0,8 $\mu\text{g/}$ orifício), entre a primeira e a quinta (0,3 $\mu\text{g/}$ orifício) concentrações testadas.

Para a paepalantina acetilada na posição 7 pudemos observar que somente a primeira (61,5 $\mu\text{g/}$ orifício) concentração testada foi estatisticamente diferente do controle negativo, mas não houve uma relação dose-resposta observada entre as concentrações testadas.

Os seus controles de toxicidade e positivos diferiram estatisticamente de todas as concentrações testadas e do controle negativo.

De acordo com a Tabela 31, 32 e 33 e as Figuras 37 a 39, podemos verificar que as paepalantinas acetiladas nas posições 5, 6 e 7, nas concentrações testadas, apresentaram, respectivamente, uma viabilidade de 86%, 101% e 99% em relação ao controle positivo.

Tabela 31. Atividade estrogênica expressa através da média das unidades de fluorescência \pm desvio padrão e equivalentes de estradiol (EEq) para diferentes concentrações testadas da isocumarina paepalantina acetilada na posição 5 (**paepalantina 5-acetilada**), além dos controles de toxicidade, negativo e positivo, na linhagem geneticamente modificada BY4741 de *S. cerevisiae*.

Paepalantina 5-acetilada (ug/ orifício)	Média \pm DP	EEq (%)	EEq geral	
10,3	8597 \pm 944*	116	média fluorescência (5 concentrações) =	2931
3,4	4559 \pm 1573*	61		
1,15	799 \pm 77*	11		
0,38	365 \pm 20	5		
0,13	336 \pm 45	5		
Controle de toxicidade	6416 \pm 1192	86	C+ =	7437
MeOH	208 \pm 34	3	EEq =	39%
Estradiol	7437 \pm 1773	100		

Controle de toxicidade: 2ª maior concentração da substância + 50 μ L de Estradiol 10 nM/ orifício; **MeOH:** controle negativo - 5 μ L de metanol em 45 μ L de cultura com D.O. 0,1 a 600 nm; **Estradiol:** controle positivo - 17- β -Estradiol 10 nM. * - Resultado estatisticamente significativo em relação ao controle negativo (P<0,05).

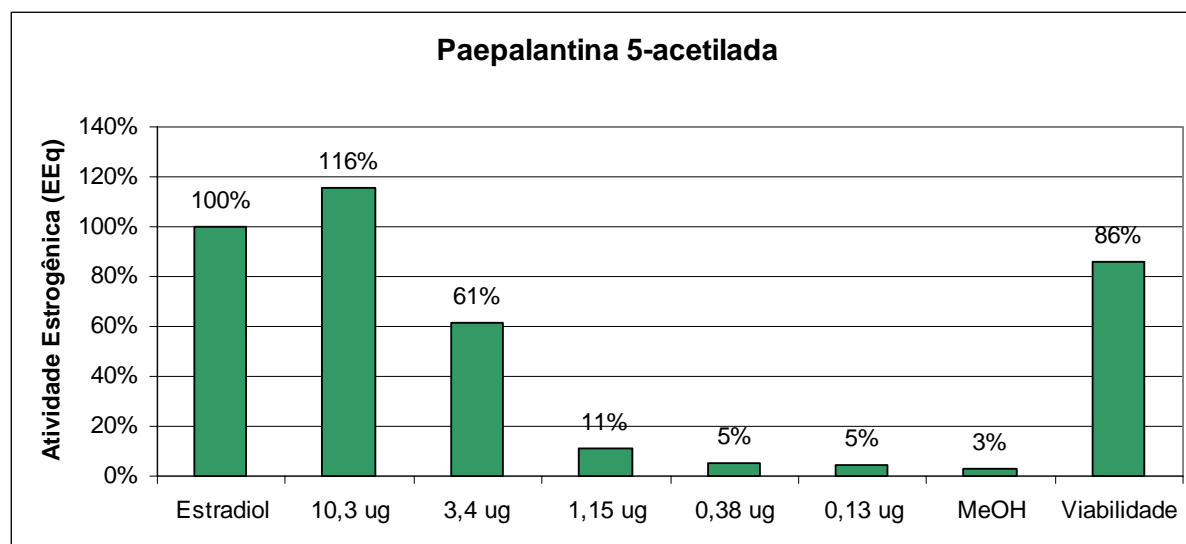


Figura 37. Atividade estrogênica expressa em Estradiol Equivalentes (EEq) para diferentes concentrações testadas da isocumarina paepalantina acetilada na posição 5 (**paepalantina 5-acetilada**), além dos controles de toxicidade, negativo e positivo, na linhagem geneticamente modificada BY4741 de *Saccharomyces cerevisiae*.

Tabela 32. Atividade estrogênica expressa através da média das unidades de fluorescência \pm desvio padrão e equivalentes de estradiol (EEq) para diferentes concentrações testadas da isocumarina paepalantina acetilada na posição 6 (**paepalantina 6-acetilada**), além dos controles de toxicidade, negativo e positivo, na linhagem geneticamente modificada BY4741 de *S. cerevisiae*.

Paepalantina 6-acetilada (ug/ orifício)	Média \pm DP	EEq (%)	EEq geral	
21,8	2293 \pm 192*	14	média fluorescência (5 concentrações) =	1144
7,3	1217 \pm 204	7		
2,4	795 \pm 179	5		
0,8	742 \pm 203	4		
0,3	671 \pm 186	4		
Controle de toxicidade	16800 \pm 3389	101	C+ =	16633
MeOH	753 \pm 443	5	EEq =	7%
Estradiol	16633 \pm 4591	100		

Controle de toxicidade: 2ª maior concentração da substância + 50 μ L de Estradiol 10 nM/ orifício; **MeOH:** controle negativo - 5 μ L de metanol em 45 μ L de cultura com D.O. 0,1 a 600 nm; **Estradiol:** controle positivo - 17- β -Estradiol 10 nM. * - Resultado estatisticamente significativo em relação ao controle negativo (P<0,05).

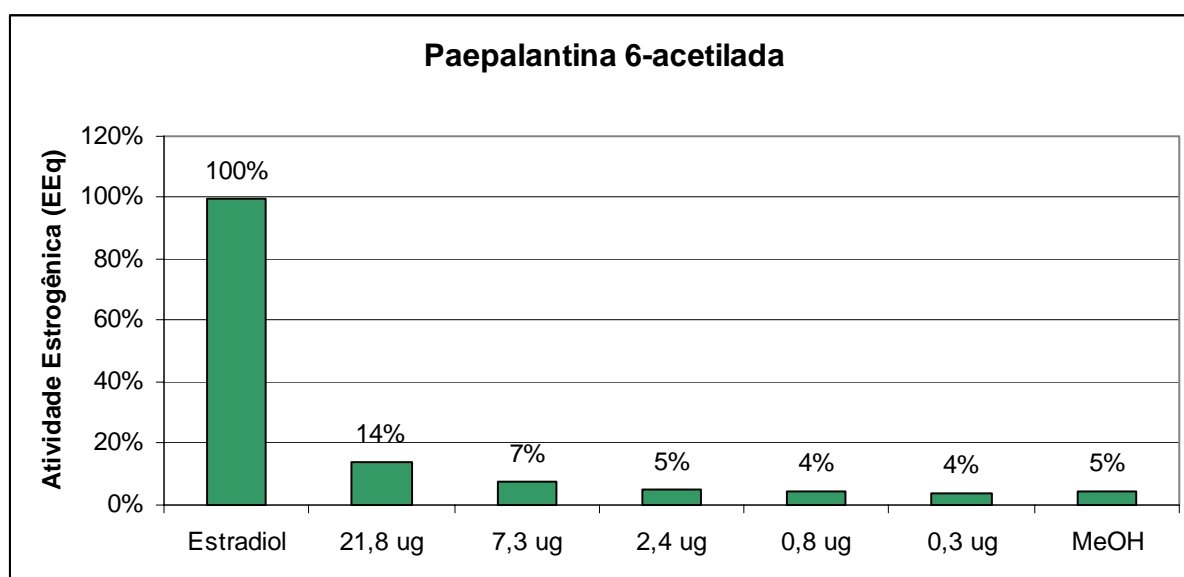


Figura 38. Atividade estrogênica expressa em Estradiol Equivalentes (EEq) para diferentes concentrações testadas da isocumarina paepalantina acetilada na posição 6 (**paepalantina 6-acetilada**), além dos controles de toxicidade, negativo e positivo, na linhagem geneticamente modificada BY4741 de *Saccharomyces cerevisiae*.

Tabela 33. Atividade estrogênica expressa através da média das unidades de fluorescência \pm desvio padrão e equivalentes de estradiol (EEq) para diferentes concentrações testadas da isocumarina paepalantina acetilada na posição 7 (**paepalantina 7-acetilada**), além dos controles de toxicidade, negativo e positivo, na linhagem geneticamente modificada BY4741 de *S. cerevisiae*.

Paepalantina 7-acetilada (ug/ orifício)	Média \pm DP	EEq (%)	EEq geral	
61,5	2080 \pm 286*	13	média fluorescência (5 concentrações) = C+ = EEq =	1065 16633 6%
20,5	1132 \pm 260	7		
6,8	908 \pm 257	5		
2,3	635 \pm 169	4		
0,76	572 \pm 168	3		
Controle de toxicidade	16459 \pm 4019	99		
MeOH	753 \pm 443	5		
Estradiol	16633 \pm 4591	100		

Controle de toxicidade: 2ª maior concentração da substância + 50 μ L de Estradiol 10 nM/ orifício; **MeOH:** controle negativo - 5 μ L de metanol em 45 μ L de cultura com D.O. 0,1 a 600 nm; **Estradiol:** controle positivo - 17- β -Estradiol 10 nM. * - Resultado estatisticamente significativo em relação ao controle negativo (P<0,05).

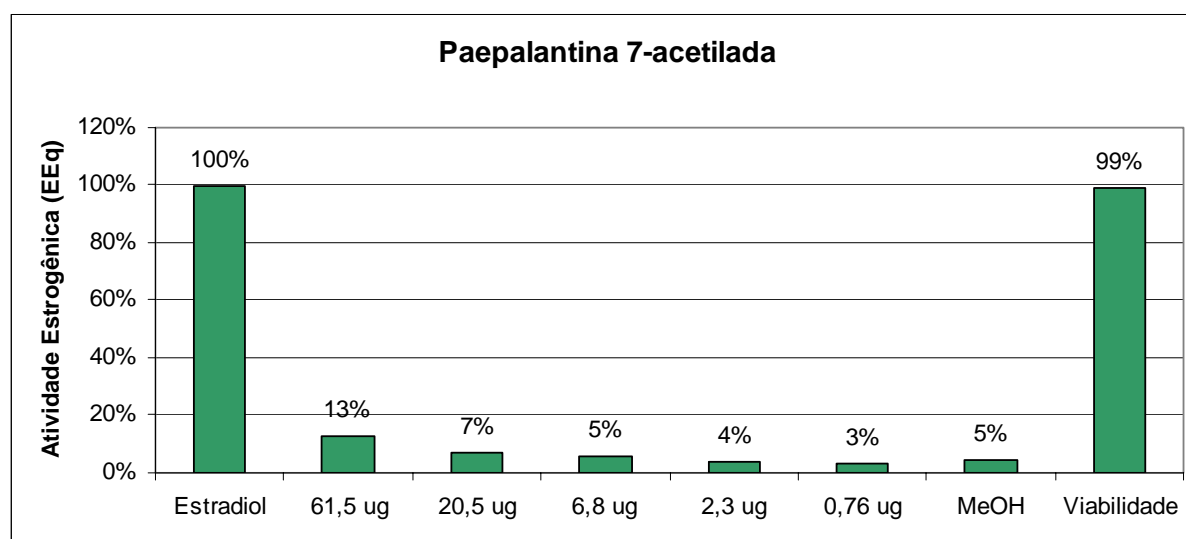


Figura 39. Atividade estrogênica expressa em Estradiol Equivalentes (EEq) para diferentes concentrações testadas da isocumarina paepalantina acetilada na posição 7 (**paepalantina 7-acetilada**), além dos controles de toxicidade, negativo e positivo, na linhagem geneticamente modificada BY4741 de *Saccharomyces cerevisiae*.

4. 2. Teste de Ames

4. 2. 1. Teste de Ames com extratos, frações enriquecidas e substâncias isoladas de *E. ligulatum*

- **Extratos:**

Para melhor entendimento acerca dos resultados, os dados da avaliação da mutagenicidade (projeto PIBIC 2004/2005) do extrato metanólico e diclorometânico de *E. ligulatum*, na ausência e na presença de metabolização, foram dispostos na Tabela 34.

De acordo com a Tabela 34, em ausência de metabolização (-S9), podemos observar que o extrato metanólico de *E. ligulatum* (**E.I. MeOH**), para a linhagem TA97a, apresentou mutagenicidade positiva para todas as concentrações testadas (0,6; 1,2; 2,3; 4,6 e 6,9 mg/placa), pois o RM (razão de mutagenicidade) foi maior que 2 para todas as concentrações e houve um aumento significativo na relação dose-resposta. Para as outras linhagens (TA100, TA98 e TA102) a mutagenicidade foi considerada negativa. O extrato diclorometânico de *E. ligulatum* (**E.I. CH₂Cl₂**) apresentou mutagenicidade positiva somente para a linhagem TA98, pois o RM foi maior que 2 nas duas últimas concentrações testadas (5,8 e 8,7 mg/placa) e houve uma relação dose resposta ($P < 0,05$). Já para as outras linhagens (TA100, TA97a, TA102), a mutagenicidade foi considerada negativa, por não atender a nenhum dos parâmetros descritos anteriormente.

Nos ensaios em presença de metabolização (+S9), o extrato metanólico de *E. ligulatum* apresentou mutagenicidade positiva para a linhagem TA100 na concentração de 2,3 mg/placa, para a linhagem TA97a em todas as concentrações testadas e para a linhagem TA102 também em todas as concentrações testadas, exceto na concentração de 4,6 mg/placa. O extrato diclorometânico de *E. ligulatum* não apresentou mutagenicidade positiva, na presença de metabolização, para nenhuma das linhagens testadas.

Tabela 34: Atividade mutagênica expressa pelo número médio de revertentes/placa e razão de mutagenicidade (RM) dos extratos: metanólico (E.I. MeOH) e diclorometânico (E.I. CH₂Cl₂) de *E. ligulatum* em linhagens de *S.typhimurium* em ausência de metabolização (-S9) e na presença de metabolização (+S9).

Linhagens de <i>S.typhimurium</i>								
Tratamento mg/placa	TA100		TA98		TA97a		TA102	
E.I. MeOH	- S9	+ S9	- S9	+ S9	- S9	+ S9	- S9	+ S9
DMSO	221 ± 5	92 ± 8	19 ± 5	24 + 4	133 ± 19	159 + 10	293 ± 17	335 + 20
0,6	289 ± 7 (1,3)	154 + 18 (1,7)*	29 ± 1 (1,5)	34 + 7 (1,4)	1052 ± 97 (7,9)**	836 + 124 (5,2)**	328 ± 14 (1,1)	746 + 86 (2,2)**
1,2	334 ± 15 (1,5)	157 + 20 (1,7)*	31 ± 0 (1,6)	28 + 5 (1,2)	1209 ± 142 (9,0)**	844 + 18 (5,3)**	295 ± 18 (1,0)	681 + 71 (2,0)**
2,3	331 ± 16 (1,5)	195 + 51 (2,1)*	26 ± 4 (1,4)	34 + 3 (1,4)	1113 ± 103 (8,4)**	747 + 78 (4,7)**	311 ± 8 (1,1)	1093 + 270 (3,3)*
4,6	235 ± 15 (1,1)	171 + 23 (1,9)*	34 ± 4 (1,8)	31 + 2 (1,3)	952 ± 65 (7,2)**	541 + 50 (3,4)**	287 ± 18 (1,0)	568 + 86 (1,7)*
6,9	148 ± 3 (0,7)	116 + 17 (1,3)	32 ± 10 (1,7)	30 + 5 (1,3)	619 ± 56 (4,7)**	759 + 227 (4,8)*	296 + 16 (1,0)	730 + 184 (2,2)
Controle +	965 ± 83 ^a	2174 + 348 ^d	726 ± 99 ^b	480 + 43 ^d	1026 ± 129 ^b	2189 + 171 ^d	1650 ± 25 ^c	3364 + 437 ^e
<hr/>								
E.I. CH ₂ Cl ₂	- S9	+ S9	- S9	+ S9	- S9	+ S9	- S9	+ S9
DMSO	173 ± 29	92 + 8	19 ± 5	24 + 4	159 ± 24	159 + 10	252 ± 12	335 + 20
0,7	177 ± 12 (1,0)	111 + 9 (1,2)	28 ± 2 (1,5)	29 + 3 (1,2)	162 ± 9 (1,0)	190 + 22 (1,2)	231 ± 15 (0,9)	395 + 45 (1,2)
1,4	178 ± 13 (1,0)	111 + 14 (1,2)	26 ± 6 (1,4)	24 + 7 (1,0)	135 ± 30 (0,9)	186 + 32 (1,2)	221 ± 25 (0,9)	395 + 9 (1,2)
2,9	190 ± 12 (1,1)	145 + 21 (1,6)*	32 ± 4 (1,7)	19 + 3 (0,8)	147 ± 9 (0,9)	143 + 3 (0,9)	211 ± 12 (0,8)	343 + 14 (1,0)
5,8	179 ± 21 (1,0)	114 + 8 (1,2)	46 ± 6 (2,4)*	22 + 6 (0,9)	153 ± 12 (1,0)	166 + 27 (1,0)	246 ± 10 (1,0)	365 + 5 (1,1)
8,7	120 ± 15 (0,7)	120 + 20 (1,3)	46 ± 14 (2,4)*	17 + 2 (0,7)	156 ± 13 (1,0)	143 + 13 (0,9)	272 ± 16 (1,1)	333 + 13 (1,0)
Controle+	955 ± 92 ^a	2174 + 348 ^d	726 ± 99 ^b	480 + 43 ^d	975 ± 46 ^b	2189 + 171 ^d	1650 ± 25 ^c	3364 + 437 ^e

DMSO: 75 µL por placa (controle negativo); Controles +: ^a Azida sódica (2,5 µg /placa); ^b 4-nitro-*o*-phenilenediamina – 10 µg/placa; ^c Mitomicina (0,5 µg /placa); ^d 2-Antramine (1,25 µg /placa); ^e Aminofluorene (10 µg /placa). * P < 0,05 e ** P < 0,01.

- **Frações:**

Nas Tabelas 35 e 36 estão os valores de mutagenicidade (número médio de revertentes por placa e índice de mutagenicidade) encontrados nas 3 frações enriquecidas (**FG** – Flavonóides Glicosilados; **FGI** – Flavonóides Glicosilados + Isocumarinas; **FAI** – Flavonóides Agliconas + Isocumarinas) do extrato metanólico e na **FR** - restante desse mesmo extrato de *E. ligulatum* nas linhagens de *S. typhimurium* em ausência (-S9) e presença de metabolização (+S9).

Na Tabela 35 estão dispostos os dados das frações **FG** e **FGI**. Em ausência de metabolização (-S9), para a fração de flavonóides glicosilados a mutagenicidade foi considerada negativa para todas as concentrações testadas (0,4; 0,8; 1,5; 3,0 e 4,6 mg/placa), em todas as linhagens (TA100, TA98, TA97a e TA102). A fração de flavonóides glicosilados + isocumarinas, para a linhagem TA97a, apresentou mutagenicidade positiva para todas as concentrações testadas (0,6; 1,1; 2,2; 4,5 e 6,7 mg/placa), pois o RM foi maior que 2 para as quatro últimas concentrações e houve um aumento significativo na relação dose-resposta ($P < 0,05$ e $P < 0,01$). Ainda na **FGI**, para a linhagem TA100, verificaram-se indícios de mutagenicidade positiva, pois o IM não foi maior que 2 em nenhuma das concentrações testadas, mas houve um aumento no número de revertentes em uma das concentrações (na concentração de 2,2 mg/placa; $P < 0,05$). Em presença de metabolização (+S9), para a fração **FG** a mutagenicidade também foi considerada negativa para todas as concentrações testadas (0,4; 0,8; 1,5; 3,0 e 4,6 mg/placa), em todas as linhagens (TA100, TA98, TA97a e TA102). Já para a fração **FGI** foi verificada mutagenicidade positiva para a linhagem TA97a, em todas as concentrações testadas (0,6; 1,1; 2,2; 4,5 e 6,7 mg/placa), exceto na última; e para a linhagem TA102, pois o RM foi maior que 2 para a segunda e quarta concentrações. Para a linhagem TA97a; e para a linhagem TA102, nas duas últimas concentrações houve um aumento significativo na relação dose-resposta ($P < 0,05$ e $P <$

0,01). Ainda na fração **FGI**, para a linhagem TA100, verificou-se indícios de mutagenicidade positiva, pois o RM não foi maior que 2 em nenhuma das concentrações testadas, mas houve uma relação dose resposta nas três últimas concentrações testadas (2,2 e 6,7 mg/placa; $P < 0,05$ e $P < 0,01$, respectivamente).

Na Tabela 36, estão os dados das frações **FAI** (0,1; 0,2; 0,4; 0,8; 1,2 mg/placa) e **FR** (0,05; 0,1; 0,2; 0,4; 0,6 mg/placa) do extrato metanólico de *E. ligulatum*. Verificou-se que, em ausência de metabolização (-S9), a mutagenicidade foi considerada negativa para todas as concentrações testadas, de ambas as frações, em todas as linhagens (TA100, TA98, TA97a e TA102). Em presença de metabolização (+S9), verificou-se mutagenicidade positiva para a linhagem TA102, em todas as concentrações testadas (0,1; 0,2; 0,4; 0,8; 1,2 mg/placa) da fração **FAI**, pois o RM foi maior que 2 para a última concentração e houve um aumento significativo na relação dose-resposta ($P < 0,05$ e $P < 0,01$). Para as outras linhagens (TA100, TA98 e TA97a) a mutagenicidade foi considerada negativa. Para a fração **FR** do extrato metanólico de *E. ligulatum* verificou-se que, em presença de metabolização (+S9), a mutagenicidade foi considerada negativa para todas as concentrações testadas (0,05; 0,1; 0,2; 0,4; 0,6 mg/placa), em todas as linhagens (TA100, TA98, TA97a e TA102).

Tabela 35: Atividade mutagênica expressa pelo número médio de revertentes/placa e razão de mutagenicidade (RM) das frações **FG** e **FGI** do extrato metanólico de *E. ligulatum* em linhagens de *S. typhimurium* em ausência (-S9) e em presença de metabolização (+S9).

Linhagens de <i>S. typhimurium</i>								
Tratamento mg/placa	TA100		TA98		TA97a		TA102	
	- S9	+ S9	- S9	+ S9	- S9	+ S9	- S9	+ S9
FG								
DMSO	179 ± 17	166 ± 18	23 ± 5	36 ± 7	180 ± 17	143 ± 17	428 ± 26	313 ± 15
0,4	192 ± 18 (1,1)	158 ± 16 (1,0)	29 ± 1 (1,3)	29 ± 8 (0,8)	192 ± 29 (1,1)	157 ± 16 (1,1)	388 ± 9 (0,9)	334 ± 18 (1,1)
0,8	174 ± 10 (1,0)	185 ± 13 (1,1)	26 ± 4 (1,1)	36 ± 9 (1,0)	166 ± 14 (0,9)	133 ± 40 (0,9)	330 ± 37 (0,8)	356 ± 43 (1,1)
1,5	207 ± 20 (1,2)	190 ± 12 (1,1)	28 ± 4 (1,2)	33 ± 7 (0,9)	163 ± 17 (0,9)	165 ± 14 (1,2)	347 ± 23 (0,8)	317 ± 8 (1,0)
3,0	197 ± 9 (1,1)	174 ± 18 (1,0)	30 ± 4 (1,3)	32 ± 4 (0,9)	136 ± 25 (0,8)	149 ± 31 (1,0)	308 ± 24 (0,7)	320 ± 29 (1,0)
4,6	211 ± 3 (1,2)	189 ± 19 (1,1)	26 ± 5 (1,1)	32 ± 4 (0,9)	147 ± 5 (0,8)	128 ± 11 (0,9)	298 ± 2 (0,7)	335 ± 33 (1,1)
Controle +	3089 ± 140 ^a	3453 ± 65 ^d	2866 ± 822 ^b	1763 ± 67 ^d	1430 ± 123 ^b	2271 ± 90 ^d	2401 ± 324 ^c	2335 ± 312 ^e
FGI								
DMSO	238 ± 31	166 ± 18	23 ± 5	36 ± 7	180 ± 17	143 ± 17	348 ± 33	313 ± 15
0,6	298 ± 16 (1,3)	216 ± 16 (1,3)	23 ± 5 (1,0)	34 ± 1 (0,9)	275 ± 15 (1,5)*	261 ± 43 (1,8)*	427 ± 5 (1,2)	491 ± 55 (1,6)*
1,1	209 ± 53 (0,9)	263 ± 42 (1,6)	26 ± 2 (1,1)	34 ± 9 (0,9)	363 ± 59 (2,0)*	297 ± 30(2,1)**	413 ± 9 (1,2)	522 ± 49(1,7)**
2,2	323 ± 20 (1,8)*	309 ± 48 (1,9)*	27 ± 5 (1,2)	34 ± 3 (0,9)	437 ± 23 (2,4)**	276 ± 36 (1,9)*	473 ± 20 (1,4)	547 ± 61(1,8)*
4,5	280 ± 52 (1,2)	266 ± 37 (1,6)*	30 ± 6 (1,3)	24 ± 4 (0,7)	392 ± 81 (2,2)*	295 ± 22(2,1)**	453 ± 26 (1,3)	758 ± 2 (2,4)**
6,7	298 ± 39 (1,3)	262 ± 15 (1,6)*	30 ± 5 (1,3)	39 ± 8 (1,1)	427 ± 53 (2,4)**	262 ± 60 (1,8)	428 ± 41 (1,3)	695 ± 51(2,2)**
Controle+	2592 ± 233 ^a	3453 ± 65 ^d	2866 ± 822 ^b	1763 ± 67 ^d	1430 ± 123^b	2271 ± 90^d	2401 ± 324 ^c	2335 ± 312^e

DMSO: 75 µL por placa (controle negativo); **Controles +:** ^a Azida sódica (2,5 µg /placa); ^b 4-nitro-*o*-phenilenediamina – 10 µg/placa; ^c Mitomicina (0,5 µg /placa);

^d 2-Antramine (1,25 µg /placa); ^e Aminofluorene (10 µg /placa). * P < 0,05 e ** P < 0,01.

Tabela 36: Atividade mutagênica expressa pelo número médio de revertentes/placa e razão de mutagenicidade (RM) das frações **FAI** e **FR** do extrato metanólico de *E. ligulatum* em linhagens de *S. typhimurium* em ausência (-S9) e em presença de metabolização (+S9).

Linhagens de <i>S. typhimurium</i>								
Tratamento mg/placa	TA100		TA98		TA97a		TA102	
FAI	- S9	+ S9	- S9	+ S9	- S9	+ S9	- S9	+ S9
DMSO	179 ± 17	166 ± 18	23 ± 5	33 ± 4	180 ± 17	143 ± 17	348 ± 33	313 ± 15
0,1	198 ± 9 (1,1)	197 ± 26 (1,2)	28 ± 6 (1,2)	39 ± 5 (1,2)	203 ± 11 (1,1)	200 ± 33 (1,4)	436 ± 22 (1,3)	469 ± 45 (1,5)*
0,2	195 ± 16 (1,1)	192 ± 22 (1,2)	26 ± 2 (1,1)	42 ± 8 (1,3)	198 ± 11 (1,1)	189 ± 48 (1,3)	329 ± 24 (1,0)	567 ± 39 (1,8)**
0,4	182 ± 13 (1,0)	215 ± 6 (1,3)	28 ± 3 (1,2)	38 ± 6 (1,2)	254 ± 14 (1,4)	215 ± 9 (1,5)	211 ± 13 (0,6)	545 ± 54 (1,7)**
0,8	155 ± 15 (0,9)	242 ± 10 (1,5)	25 ± 2 (1,1)	37 ± 6 (1,1)	178 ± 28 (1,0)	212 ± 11 (1,5)	188 ± 13 (0,5)	602 ± 58 (1,9)**
1,2	----	222 ± 13 (1,3)	24 ± 4 (1,0)	28 ± 3 (0,9)	171 ± 8 (1,0)	186 ± 12 (1,3)	208 ± 14 (0,6)	649 ± 4 (2,1)**
Controle +	3089 ± 140 ^a	3453 ± 65 ^d	2866 ± 822 ^b	2003 ± 254 ^d	1430 ± 123 ^b	2271 ± 90 ^d	2401 ± 324 ^c	2335 ± 312^e
FR	- S9	+ S9	- S9	+ S9	- S9	+ S9	- S9	+ S9
DMSO	179 ± 17	166 ± 18	23 ± 5	33 ± 4	180 ± 17	143 ± 17	348 ± 33	313 ± 15
0,05	190 ± 17 (1,1)	183 ± 5 (1,1)	20 ± 4 (0,9)	33 ± 3 (1,0)	156 ± 6 (0,9)	197 ± 7 (1,4)	337 ± 49 (1,0)	392 ± 19 (1,3)
0,1	177 ± 12 (1,0)	180 ± 16 (1,1)	23 ± 4 (1,0)	37 ± 8 (1,1)	189 ± 19 (1,1)	109 ± 94 (0,8)	327 ± 14 (0,9)	369 ± 22 (1,2)
0,2	180 ± 6 (1,0)	203 ± 17 (1,2)	25 ± 4 (1,1)	39 ± 5 (1,2)	172 ± 17 (1,0)	174 ± 11 (1,2)	349 ± 27 (1,0)	355 ± 87 (1,1)
0,4	179 ± 3 (1,0)	143 ± 65 (0,9)	24 ± 1 (1,0)	34 ± 11 (1,0)	184 ± 25 (1,0)	154 ± 10 (1,1)	323 ± 17 (0,9)	376 ± 43 (1,2)
0,6	175 ± 7 (1,0)	208 ± 12 (1,3)	28 ± 3 (1,2)	31 ± 1 (0,9)	183 ± 18 (1,0)	155 ± 24 (1,1)	297 ± 13 (0,9)	348 ± 46 (1,1)
Controle+	3089 ± 140 ^a	3453 ± 65 ^d	2866 ± 822 ^b	2003 ± 254 ^d	1430 ± 123 ^b	2271 ± 90 ^d	2401 ± 324 ^c	2335 ± 312^e

DMSO: 75 µL por placa (controle negativo); **Controles +:** ^a Azida sódica (2,5 µg /placa); ^b 4-nitro-*o*-phenilenediamina – 10 µg/placa; ^c Mitomicina (0,5 µg /placa); ^d 2-Antramine 1,25 µg /placa); ^e Aminofluorene (10 µg /placa). * P < 0,05 e ** P < 0,01.

- **Substâncias isoladas:**

Os dados da avaliação da mutagenidade das substâncias isoladas da planta *E. ligulatum* foram dispostos nas Tabelas 37, 38 e 39. Para a avaliação da mutagenicidade das substâncias isoladas, nós escolhemos as linhagens TA97a e TA102, pois, foram as que apresentaram os resultados mais relevantes na avaliação da mutagenicidade dos extratos e frações enriquecidas de *E. ligulatum*.

De acordo com a Tabela 37, a substância isolada **E.I. 1** foi considerada mutagênica apenas na presença de metabolização (+S9), em ambas as linhagens testadas, onde seu RM foi maior de 2 em todas as concentrações testadas (29,6; 59,3 e 118,5 µg/placa), exceto na de 59,3 µg/placa, na linhagem TA102. Ainda para a **E.I. 1**, para a mesma linhagem TA102, foi verificado um indício de mutagenicidade, na ausência de metabolização (-S9), pois o RM não foi maior de 2, mas houve uma relação dose-resposta ($P < 0,05$).

Ainda de acordo com a Tabela 37, a substância isolada **E.I. 2** também foi considerada mutagênica apenas na presença de metabolização (+S9), em ambas as linhagens testadas, onde seu RM foi maior de 2 em todas as concentrações testadas (27,0; 54,0 e 108,0 µg/placa), exceto na de 54,0 µg/placa, na linhagem TA102. Ainda para a **E.I. 2**, para a linhagem TA102, foi verificado um indício de mutagenicidade, na ausência de metabolização (-S9), pois o RM não foi maior de 2, mas houve uma relação dose-resposta. ($P < 0,05$).

De acordo com a Tabela 38, a substância isolada **E.I. 3** foi considerada mutagênica apenas na presença de metabolização (+S9), em ambas as linhagens testadas, onde seu RM foi maior de 2 em todas as concentrações testadas (8,2; 16,4 e 32,7 µg/placa).

Ainda de acordo com a Tabela 38, a substância isolada **E.I. 4** foi considerada mutagênica na ausência de metabolização (-S9) apenas na linhagem TA97a, pois seu RM foi maior que 2 em uma concentração testada (43,25 µg/placa). E também foi considerada mutagênica na presença de metabolização (+S9), em ambas as linhagens testadas, onde seu

RM foi maior de 2 em todas as concentrações testadas (10,8; 21,6 e 43,25 µg/placa), exceto na concentração de 10,8 µg/placa, na linhagem TA102.

De acordo com a Tabela 39, a substância isolada **E.I. 5**, também conhecida como “Eriocaulina”, foi considerada muito mutagênica na ausência de metabolização (-S9) na linhagem TA97a, pois em todas as concentrações testadas (1,25; 2,5; 5,0; 7,5 e 15,0 µg/placa) o seu RM foi muito maior de 2. Ainda sem metabolização (-S9), para a linhagem TA102, a mutagenicidade foi considerada negativa, pois em nenhuma das concentrações o RM foi maior que 2 e não houve um aumento do crescimento bacteriano com o aumento da dose da substância testada. Na presença de metabolização (+S9), a substância **E.I. 5** foi considerada também mutagênica em ambas as linhagens testadas, pois seu RM foi maior de 2 em todas as concentrações testadas (2,5; 5,0; 7,5 e 15,0 µg/placa), na linhagem TA97a, exceto na de 2,5 µg/placa; e apenas na última concentração (15,0 µg/placa), na linhagem TA102.

Tabela 37: Atividade mutagênica expressa pelo número médio de revertentes/placa e razão de mutagenicidade (RM) das substâncias isoladas (**E.I. 1:** 6-metoxiapigenina-7-*O*- β -D-glucopiranosídeo e **E.I. 2:** 6-metoxiapigenina-7-*O*- β -D-alopiranosídeo) da planta *E. ligulatum* em linhagens de *S. typhimurium* na ausência (-S9) e na presença de metabolização (+S9).

Linhagens de <i>S.typhimurium</i>				
Tratamento $\mu\text{g/placa}$	TA97a		TA102	
	- S9	+ S9	- S9	+ S9
E.I. 1				
DMSO	274 \pm 54	125 \pm 18	268 \pm 5	252 \pm 47
29,6	280 \pm 9 (1,0)	287 \pm 7 (2,3)**	435 \pm 26 (1,6)*	615 \pm 63 (2,4)**
59,3	267 \pm 1 (1,0)	253 \pm 46 (2,0)*	437 \pm 25 (1,6)*	435 \pm 84 (1,8)
118,5	270 \pm 3 (1,0)	274 \pm 55 (2,2)*	450 \pm 3 (1,7)*	512 \pm 62 (2,0)*
237,0	237 \pm 21 (0,9)	-----	471 \pm 212 (1,8)	-----
355,5	225 \pm 36 (0,8)	-----	440 \pm 15 (1,6)*	-----
Controle +	1444 \pm 593 ^b	2174 \pm 348 ^d	4031 \pm 26 ^c	3976 \pm 252 ^e
E.I. 2				
DMSO	274 \pm 54	125 \pm 18	268 \pm 5	252 \pm 47
27,0	280 \pm 8 (1,0)	283 \pm 26 (2,3)**	443 \pm 38 (1,7)*	518 \pm 56 (2,1)*
54,0	280 \pm 7 (1,0)	284 \pm 25 (2,3)**	431 \pm 10 (1,6)*	477 \pm 60 (1,9)*
108,0	256 \pm 20 (0,9)	256 \pm 20 (2,1)**	451 \pm 3 (1,7)*	504 \pm 11 (2,0)**
216,0	217 \pm 33 (0,8)	-----	435 \pm 16 (1,6)*	-----
324,0	254 \pm 8 (0,9)	-----	325 \pm 73 (1,2)	-----
Controle+	1444 \pm 593 ^b	2174 \pm 348 ^d	4031 \pm 26 ^c	3976 \pm 252 ^e

DMSO: 75 μL por placa (controle negativo); **Controles +:** ^a Azida sódica (2,5 μg /placa); ^b 4-nitro-*o*-phenilenediamina – 10 μg /placa; ^c Mitomicina (0,5 μg /placa); ^d 2-Antramine (1,25 μg /placa); ^e Aminofluorene (10 μg /placa). * P < 0,05 e ** P < 0,01.

Tabela 38: Atividade mutagênica expressa pelo número médio de revertentes/placa e razão de mutagenicidade (RM) das substâncias isoladas (**E.I. 3:** 6,4'-dimetoxicanferol-3-*O*- β -D-6''[(*E*) *p*-cumaroil] glucopiranosídeo e **E.I. 4:** 6-metoxiapigenina) da planta *E. ligulatum* em linhagens de *S. typhimurium* na ausência (-S9) e na presença de metabolização (+S9).

Linhagens de <i>S.typhimurium</i>				
Tratamento $\mu\text{g/placa}$	TA97a		TA102	
	- S9	+ S9	- S9	+ S9
E.I. 3				
DMSO	167 \pm 9	125 \pm 18	326 \pm 22	252 \pm 47
8,2	284 \pm 9 (1,7)*	271 \pm 9 (2,2)**	312 \pm 33 (1,0)	515 \pm 40 (2,0)**
16,4	293 \pm 16 (1,8)*	285 \pm 46 (2,3)*	357 \pm 15 (1,1)	546 \pm 80 (2,2)*
32,7	284 \pm 41 (1,7)*	299 \pm 21 (2,4)**	397 \pm 7 (1,2)	571 \pm 150 (2,3)
65,5	175 \pm 45 (1,1)	-----	339 \pm 23 (1,0)	-----
98,25	145 \pm 13 (0,9)	-----	276 \pm 33 (0,9)	-----
Controle +	1444 \pm 593 ^b	2174 \pm 348 ^d	4031 \pm 26 ^c	3976 \pm 252 ^e
E.I. 4				
DMSO	167 \pm 9	125 \pm 18	326 \pm 22	252 \pm 47
10,8	279 \pm 37 (1,7)	291 \pm 18 (2,3)**	346 \pm 1 (1,1)	454 \pm 148 (1,8)
21,6	273 \pm 32 (1,6)	283 \pm 19 (2,3)**	351 \pm 23 (1,1)	547 \pm 5 (2,2)**
43,25	332 \pm 21 (2,0)*	309 \pm 28 (2,5)**	338 \pm 1 (1,0)	561 \pm 99 (2,2)*
86,5	215 \pm 32 (1,3)	-----	359 \pm 7 (1,1)	-----
129,75	198 \pm 21 (1,2)	-----	308 \pm 24 (1,0)	-----
Controle+	1444 \pm 593 ^b	2174 \pm 348 ^d	4031 \pm 26 ^c	3976 \pm 252 ^e

DMSO: 75 μL por placa (controle negativo); **Controles +:** ^a Azida sódica (2,5 $\mu\text{g/placa}$); ^b 4-nitro-*o*-phenilenediamina – 10 $\mu\text{g/placa}$; ^c Mitomicina (0,5 $\mu\text{g/placa}$); ^d 2-Antramine (1,25 $\mu\text{g/placa}$); ^e Aminofluorene (10 $\mu\text{g/placa}$). * P < 0,05 e ** P < 0,01.

Tabela 39: Atividade mutagênica expressa pelo número médio de revertentes/placa e razão de mutagenicidade (RM) das substâncias isolada (**E.I. 5:** Eriocaulina) da planta *E. ligulatum* em linhagens de *S.typhimurium* na ausência (-S9) e na presença de metabolização (+S9).

Linhagens de <i>S.typhimurium</i>				
Tratamento µg/placa	TA97a		TA102	
	- S9	+ S9	- S9	+ S9
DMSO	121 ± 10	295 ± 25	268 ± 5	239 ± 27
1,25	645 ± 35 (5,3)**	-----	345 ± 21 (1,3)	-----
2,5	2108 ± 367 (17,4)**	468 ± 46 (1,6)*	335 ± 10 (1,3)	339 ± 45 (1,4)
5,0	3333 ± 733 (27,5)**	891 ± 51 (3,0)**	314 ± 54 (1,2)	375 ± 83 (1,6)
7,5	4545 ± 390 (37,6)**	1517 ± 254 (5,1)**	392 ± 35 (1,5)	432 ± 81 (1,8)
15,0	5067 ± 48 (41,9)**	5042 ± 227 (17,1)**	474 ± 60 (1,8)*	491 ± 14 (2,1)**
Controle +	955 ± 82 ^b	2174 ± 348 ^d	4031 ± 26 ^c	3976 ± 252 ^e

DMSO: 45 µL por placa (controle negativo); Controles +: ^a Azida sódica (2,5 µg /placa); ^b 4-nitro-*o*-phenilenediamina – 10 µg/placa; ^c Mitomicina (0,5 µg /placa); ^d 2-Antramine (1,25 µg /placa); ^e Aminofluorene (10 µg /placa). * P < 0,05 e ** P < 0,01.

4. 2. 2. Teste de Ames com extratos de *L. flavescens*

Na Tabela 40, estão dispostos os dados da avaliação da mutagenicidade dos extratos metanólico (**L. f. MeOH**) e diclorometânico de *L. flavescens* (**L. f. CH₂Cl₂**). O extrato metanólico foi avaliado nas concentrações de 1,6; 3,2; 6,5; 12,9 e 19,4 mg/placa e o extrato diclorometânico nas de 0,1; 0,2; 0,5; 0,7 e 0,9 mg/placa. Verificou-se que, tanto em ausência (-S9), quanto na presença de metabolização (+S9), a mutagenicidade foi considerada negativa para todas as concentrações testadas, de ambos os extratos, em todas as linhagens testadas (TA100, TA98, TA97a e TA102). Houve apenas um indício de mutagenicidade para o extrato metanólico na linhagem TA102, na presença de metabolização (destacado em negrito na tabela).

Tabela 40: Atividade mutagênica expressa pelo número médio de revertentes/placa e razão de mutagenicidade (RM) dos extratos: metanólico (**L.f. MeOH**) e diclorometânico (**L.f. CH₂Cl₂**) de *L. flavescens* em linhagens de *S. typhimurium* em ausência de metabolização (-S9) e na presença de metabolização (+S9).

Linhagens de <i>S.typhimurium</i>								
Tratamento mg/placa	TA100		TA98		TA97a		TA102	
L.f. MeOH	- S9	+ S9	- S9	+ S9	- S9	+ S9	- S9	+ S9
DMSO	159 ± 22	176 ± 12	48 ± 1	43 ± 2	130 ± 2	177 ± 5	231 ± 20	326 ± 34
1,6	143 ± 21 (0,9)	217 ± 14 (1,2)	45 ± 4 (0,9)	58 ± 8 (1,4)	170 ± 13 (1,3)	159 ± 6 (0,9)	242 ± 54 (1,1)	391 ± 77 (1,2)
3,2	155 ± 7 (1,0)	214 ± 20 (1,2)	52 ± 5 (1,1)	54 ± 3 (1,3)	152 ± 24 (1,2)	146 ± 20 (0,8)	184 ± 24 (0,8)	423 ± 4 (1,3)
6,5	165 ± 0 (1,0)	198 ± 26 (1,1)	47 ± 3 (1,0)	65 ± 2 (1,5)	154 ± 8 (1,2)	196 ± 37 (1,1)	200 ± 24 (0,9)	458 ± 55 (1,4)
12,9	162 ± 4 (1,0)	219 ± 16 (1,2)	49 ± 4 (1,0)	53 ± 4 (1,2)	149 ± 10 (1,2)	195 ± 47 (1,1)	198 ± 28 (0,9)	487 ± 36 (1,5)*
19,4	172 ± 6 (1,1)	237 ± 8 (1,4)	48 ± 0 (1,0)	58 ± 2 (1,4)	133 ± 10 (1,0)	178 ± 9 (1,0)	247 ± 22 (1,1)	523 ± 57 (1,6)*
Controle +	2671 ± 120 ^a	2671 ± 120 ^d	2493 ± 133 ^b	2318 ± 104 ^d	2695 ± 627 ^b	2785 ± 307 ^d	4112 ± 171 ^c	4045 ± 84^e
L.f. CH ₂ Cl ₂	- S9	+ S9	- S9	+ S9	- S9	+ S9	- S9	+ S9
DMSO	112 ± 16	176 ± 12	28 ± 0	43 ± 2	151 ± 2	177 ± 5	196 ± 62	326 ± 34
0,1	119 ± 23 (1,1)	190 ± 21 (1,1)	30 ± 6 (1,1)	56 ± 14 (1,3)	134 ± 34 (0,9)	198 ± 40 (1,1)	220 ± 56 (1,1)	460 ± 2 (1,4)
0,2	147 ± 25 (1,3)	194 ± 6 (1,1)	23 ± 5 (0,8)	64 ± 4 (1,5)	161 ± 15 (1,1)	207 ± 0 (1,2)	294 ± 16 (1,5)	377 ± 10 (1,2)
0,5	128 ± 4 (1,1)	180 ± 35 (1,0)	25 ± 8 (0,9)	48 ± 10 (1,1)	161 ± 31 (1,1)	137 ± 1 (0,8)	181 ± 9 (0,9)	359 ± 11 (1,1)
0,7	119 ± 14 (1,1)	163 ± 4 (0,9)	22 ± 4 (0,8)	50 ± 7 (1,2)	171 ± 0 (1,1)	167 ± 9 (0,9)	171 ± 14 (0,9)	406 ± 15 (1,3)
0,9	106 ± 18 (1,0)	172 ± 12 (1,0)	23 ± 0 (0,8)	62 ± 38 (1,4)	134 ± 9 (0,9)	144 ± 1 (0,8)	160 ± 41 (0,8)	352 ± 4 (1,1)
Controle+	1469 ± 72 ^a	3069 ± 175 ^d	1885 ± 197 ^b	2318 ± 104 ^d	2410 ± 254 ^b	2785 ± 307 ^d	3875 ± 128 ^c	4045 ± 84^e

DMSO: 75 µL por placa (controle negativo); **Controles +:** ^a Azida sódica (2,5 µg /placa); ^b 4-nitro-*o*-phenilenediamina – 10 µg/placa; ^c Mitomicina (0,5 µg /placa); ^d 2-Antramine 1,25 µg /placa); ^e Aminofluorene (10 µg /placa). * P < 0,05 e ** P < 0,01.

4. 2. 3. Teste de Ames com extratos de *L. spiralis*

O extrato metanólico (**L. s. MeOH**) foi avaliado nas concentrações de 2,1; 4,2; 8,4; 16,5 e 25,0 mg/placa, nas linhagens TA100 e TA98 e nas concentrações de 0,7; 1,4; 2,8; 5,6 e 8,4 mg/placa nas linhagens TA97a e TA102 de *S. typhimurium*. O extrato diclorometânico (**L. s. CH₂Cl₂**) foi avaliado nas concentrações de 0,6; 1,1; 2,3; 4,6 e 11,4 mg/placa, nas linhagens TA100 e TA98 e nas concentrações de 0,09; 0,18; 0,37; 0,74 e 1,1 mg/placa nas linhagens de TA97a e TA102. De acordo com os dados das tabelas 41 e 42, verificou-se que, tanto em ausência (-S9), quanto na presença de metabolização (+S9), a mutagenicidade foi considerada negativa para todas as concentrações testadas, de ambos os extratos, em todas as linhagens testadas (TA100, TA98, TA97a e TA102).

Tabela 41: Atividade mutagênica expressa pelo número médio de revertentes/placa e razão de mutagenicidade (RM) dos extratos metanólico (**L.s. MeOH**) e diclorometânico (**L.s. CH₂Cl₂**) de *L. spiralis* nas linhagens TA100 e TA98 de *S. typhimurium* na ausência (-S9) e na presença de metabolização (+S9).

Linhagens de <i>S. typhimurium</i>				
Tratamento mg/placa	TA100		TA98	
L.s. MeOH	- S9	+ S9	- S9	+ S9
DMSO	194 ± 11	114 ± 13	30 ± 8	24 ± 7
2,1	220 ± 8 (1,1)	135 ± 32 (1,2)	38 ± 5 (1,3)	26 ± 6 (1,1)
4,2	232 ± 14 (1,2)	147 ± 6 (1,3)	35 ± 6 (1,2)	24 ± 3 (1,0)
8,4	217 ± 16 (1,1)	152 ± 14 (1,3)	35 ± 4 (1,2)	18 ± 1 (0,8)
16,7	184 ± 4 (1,0)	126 ± 27 (1,1)	30 ± 2 (1,0)	20 ± 2 (0,8)
25,0	132 ± 9 (0,7)	96 ± 18 (0,8)	34 ± 6 (1,3)	26 ± 1 (1,1)
L.s. CH ₂ Cl ₂	- S9	+ S9	- S9	+ S9
DMSO	194 ± 11	114 ± 13	30 ± 8	24 ± 7
0,6	220 ± 7 (1,1)	149 ± 5 (1,3)	38 ± 9 (1,3)	35 ± 9 (1,5)
1,1	200 ± 20 (1,0)	140 ± 22 (1,2)	29 ± 1 (1,0)	30 ± 4 (1,3)
2,3	184 ± 32 (1,0)	154 ± 10 (1,3)	32 ± 0 (1,1)	24 ± 4 (1,0)
4,6	206 ± 14 (1,1)	152 ± 11 (1,3)	27 ± 7 (0,9)	27 ± 1 (1,1)
11,4	208 ± 13 (1,1)	145 ± 26 (1,3)	39 ± 1 (1,3)	33 ± 7 (1,4)
Controle +	1581 ± 61 ^a	1989 ± 39 ^d	1606 ± 195 ^b	1593 ± 12 ^d

DMSO: 75 µL por placa (controle negativo); **Controles +:** ^a Azida sódica (2,5 µg /placa); ^b 4-nitro-*o*-phenilenediamina – 10 µg/placa; ^c Mitomicina (0,5 µg /placa); ^d 2-Antramine (1,25 µg /placa); ^e Aminofluorene (10 µg /placa). * P < 0,05 e ** P < 0,01.

Tabela 42: Atividade mutagênica expressa pelo número médio de revertentes/placa e razão de mutagenicidade (RM) dos extratos metanólico (**L.s. MeOH**) e diclorometânico (**L.s. CH₂Cl₂**) de *L. spiralis* nas linhagens TA97a e TA102 de *S. typhimurium* na ausência (-S9) e na presença de metabolização (+S9).

Linhagens de <i>S. typhimurium</i>				
Tratamento mg/placa	TA97a		TA102	
L.s. MeOH	- S9	+ S9	- S9	+ S9
DMSO	141 ± 26	177 ± 5	328 ± 1	319 ± 14
0,7	179 ± 43 (1,3)	187 ± 32 (1,1)	312 ± 4 (1,0)	383 ± 21 (1,2)
1,4	157 ± 4 (1,1)	145 ± 0 (0,8)	328 ± 13 (1,0)	390 ± 18 (1,2)
2,8	148 ± 11 (1,1)	144 ± 6 (0,8)	335 ± 16 (1,0)	403 ± 18 (1,3)
5,6	153 ± 21 (1,1)	168 ± 31 (0,9)	273 ± 14 (0,8)	400 ± 31 (1,3)
8,4	158 ± 21 (1,1)	180 ± 12 (1,0)	237 ± 10 (0,7)	436 ± 59 (1,4)
L.s. CH ₂ Cl ₂	- S9	+ S9	- S9	+ S9
DMSO	141 ± 26	177 ± 5	328 ± 1	319 ± 14
0,09	168 ± 37 (1,2)	147 ± 15 (0,8)	322 ± 10 (1,0)	381 ± 20 (1,2)
0,18	213 ± 21 (1,5)	184 ± 5 (1,0)	318 ± 24 (1,0)	368 ± 13 (1,2)
0,37	146 ± 10 (1,0)	140 ± 43 (0,8)	267 ± 16 (0,8)	359 ± 17 (1,1)
0,74	175 ± 39 (1,2)	130 ± 14 (0,7)	243 ± 18 (0,7)	379 ± 37 (1,2)
1,10	140 ± 12 (1,0)	141 ± 23 (0,8)	178 ± 8 (0,5)	356 ± 38 (1,1)
Control +	1768 ± 141 ^b	2785 ± 307 ^d	2532 ± 51 ^c	2401 ± 324 ^e

DMSO: 75 µL por placa (controle negativo); **Controles +:** ^a Azida sódica (2,5 µg /placa); ^b 4-nitro-*o*-phenilenediamina – 10 µg/placa; ^c Mitomicina (0,5 µg /placa); ^d 2-Antramine (1,25 µg /placa); ^e Aminofluorene (10 µg /placa). * P < 0,05 e ** P < 0,01.

4. 3. Avaliação da relação estrutura-atividades estrogênica e mutagênica das substâncias isoladas de plantas da família Eriocaulaceae

4. 3. 1. Avaliação da relação estrutura-atividade estrogênica

Através da análise das características estruturais das substâncias isoladas de plantas da família Eriocaulaceae e a sua relação com a atividade estrogênica, encontrada no teste RYA, pode-se verificar que algumas delas favorecem e outras desfavorecem o aparecimento da estrogenicidade.

De acordo com os resultados obtidos no teste RYA para a espécie *E. ligulatum*, verificou-se que a adição de açúcares na estrutura básica de seus flavonóides, assim como a metoxilação em seu anel A, prejudicaram o aparecimento da estrogenicidade.

Verificou-se também que a presença de hidroxilas nas posições 7 e 4', da estrutura básica dos flavonóides, favorece o aparecimento do potencial estrogênico. Isso se deve ao fato de essas hidroxilas se assemelharem às hidroxilas presentes nas posições 3 e 17 do 17- β -estradiol.

Em relação às isocumarinas avaliadas neste trabalho, verificou-se que apenas as que tiveram pequenas modificações, como adição de açúcares e acetilações na sua estrutura básica, apresentaram resultados positivos.

Já para duas isocumarinas que estavam em forma de dímero (como a eriocaulina, o dímero 8-8' da paepalantina) os resultados foram negativos, pois acredita-se que grupos muito volumosos na cadeia lateral prejudiquem a entrada da substância na levedura e a correta interação dessa com o receptor.

A exceção foi o dímero planifolina, que apresentou resultados positivos no teste RYA, provavelmente porque sua conformação espacial não desfavoreceu tanto a sua permeabilidade e a sua correta interação com o receptor de estrógeno.

Em relação às paepalantinas com pequenas modificações na sua estrutura básica, pudemos observar que a adição de 1 açúcar favoreceu o aparecimento de estrogénicidade, mas que essa foi diminuída quando houve a adição de uma molécula adicional de açúcar à estrutura básica.

Em relação à acetilação, verificou-se que a mudança de posição do radical acetil modifica a permeabilidade e possivelmente a interação da paepalantina com o receptor.

Verificou-se também que os flavonóides de Eriocaulaceae interagiram com mais facilidade com o receptor de estrógeno do que as suas isocumarinas, já que para se obter o mesmo efeito estrogénico, utilizou-se maior quantidade de isocumarinas do que de flavonóides.

Substâncias isoladas da espécie *L. spiralis* não foram avaliadas, mas somente seus extratos, e por essa razão a sua relação estrutura-atividade estrogénica não pode ser realizada.

4. 3. 2. Avaliação da relação estrutura-atividade mutagénica

4. 3. 2. 1. Flavonóides

Foram verificadas, através da análise das estruturas dos flavonóides isolados da família Eriocaulaceae e a sua relação com a atividade mutagénica, encontrada no teste de Ames, características que favorecem e outras que desfavorecem o aparecimento do potencial mutagénico.

De acordo com a Tabela 2, podemos verificar que os flavonóides **E.I. 1**, **E.I. 2** e **E.I. 3**, isolados de *E. ligulatum*, são os únicos que estão na forma heterosídica, ou seja, que têm açúcares adicionados às suas estruturas básicas. Viu-se que para esses flavonóides com açúcares adicionados à sua estrutura básica a atividade mutagénica era diminuída, e que essa atividade não é alterada com a mudança do tipo de açúcar adicionado. Quando a mistura S9 foi utilizada, a mutagenicidade foi favorecida, mas foram encontradas razões de

mutagenicidade muito parecidas para os dois flavonóides e praticamente a mesma quantidade foi utilizada de ambos para se ter a mesma atividade.

Verificamos também que a posição em que um tipo de açúcar está adicionado na estrutura básica dos flavonóides interfere na atividade mutagênica encontrada, pois para exercerem a mesma atividade mutagênica e apresentarem razões de mutagenicidade muito parecidas, usamos quantidades diferentes dos flavonóides **E.I. 1** e **E.I. 2**. O flavonóide aglicona **E.I. 4**, também isolado de *E. ligulatum*, foi o único a apresentar mutagenicidade positiva mesmo na ausência de metabolização. Quando a metabolização foi empregada, a mutagenicidade permaneceu positiva, demonstrando que os flavonóides agliconas têm a mutagenicidade favorecida por se tratarem de grupos menos volumosos e por possuírem solubilidade diferente dos heterosídeos.

Os flavonóides luteolina (**L.f 1**) e 6-metoxiluteolina (**L.f. 2**), isolados de *L. flavescens* não foram avaliados quanto à sua mutagenicidade, pois os dados da mutagenicidade dos extratos dessa espécie foram negativos. Portanto, não foi estabelecida a sua relação estrutura-atividade.

4. 3. 2. 2. Isocumarinas

O mesmo procedimento, realizado com os flavonóides anteriormente, foi feito com as isocumarinas isoladas da família Eriocaulaceae, para elucidar a sua relação estrutura-atividade mutagênica. Foram comparadas as suas características estruturais com os dados da avaliação de suas atividades mutagênicas para o teste de Ames.

Como neste trabalho apenas foi feita a avaliação da atividade mutagênica de uma isocumarina, a **E.I. 5**, obtida do extrato diclorometânico de *E. ligulatum*, e sendo que a sua relação estrutura-atividade seria impossível de ser estabelecida somente com esses resultados, resolvemos relacioná-los a dados já publicados de avaliação da mutagenicidade de outras

isocumarinas também isoladas de plantas da família Eriocaulaceae. As isocumarinas são: paepalantina, isolada de *Paepalanthus vellozioides*; o dímero 8-8' da paepalantina e as paepalantinas mono e diheterosídicas, isolados de *P. bromelioides*; a planifolina, isolada de *P. planifolius*. Todas essas isocumarinas têm a mesma molécula em comum, a paepalantina, que essa apenas sofreu algumas modificações.

Embora os dados da avaliação da mutagenicidade no teste de Ames dessas outras substâncias isoladas já tenham sido publicados, a relação entre as suas diferentes estruturas e sua atividade mutagênica ainda não foi realizada.

A paepalantina é uma isocumarina que, quando teve a sua mutagenicidade avaliada, apresentou resultados positivos em todas as linhagens testadas. E como essa isocumarina não havia sido testada na linhagem TA97a, resolveu-se complementar a sua avaliação da mutagenicidade para poder comparar melhor os resultados encontrados para essas diferentes moléculas (Tabela 43).

Tabela 43: Atividade mutagênica expressa pelo número médio de revertentes/placa e razão de mutagenicidade (RM) das substâncias isolada, paepalantina, da planta *P. vellozioides* na linhagem TA97a de *S. typhimurium* na ausência (-S9) e na presença de metabolização (+S9).

Tratamento µg/placa paepalantina	TA 97a	
	- S9 ^a	+ S9 ^b
DMSO	167 ± 8	217 ± 8
0,06	269 ± 19 (1,6)**	252 ± 7 (1,2)*
0,12	367 ± 37 (2,2)**	271 ± 19 (1,3)*
0,25	633 ± 140 (3,8)*	338 ± 37 (1,6)*
0,50	745 ± 9 (4,5)**	706 ± 171 (3,3)*
1,0	1284 ± 112 (7,7)**	962 ± 58 (4,4)**
Controle +	907 ± 165	3122 ± 190

DMSO = controle negativo (100 µL/placa). Controle +: controle positivo: a) 4-nitro-*O*-fenilenodiamino (10,0 µg/placa); b) 2-antramine (1,25 µg/placa); * $p \leq 0.05$ (ANOVA), ** $p \leq 0.01$ (ANOVA).

Verificou-se que a paepalantina apresentou resultados extremamente significativos na linhagem TA97a e estima-se que seus resultados positivos se devam às suas hidroxilas das posições 1, 9 e 10, que estão livres para fazer pontes de hidrogênio com as bases do DNA.

A isocumarina **E.I. 5**, chamada de eriocaulina, é um dímero composto por duas moléculas de paepalantina que perderam seus radicais metoxila da posição 5 de cada um dos monômeros. Ela tem seus monômeros ligados pela posição 10 e 10' (Tabela 2). Essa isocumarina também apresentou resultados expressivos no teste de Ames, na linhagem TA97a na ausência de metabolização, mas verificou-se que esses foram menores do que os encontrados para a paepalantina, sugerindo que o fato de a eriocaulina estar em forma de dímero, desfavorece a interação de suas hidroxilas com as bases do DNA.

O mesmo acontece com os outros dois dímeros da paepalantina, isolados de outras plantas da família Eriocaulaceae, a planifolina e o dímero 8-8' da paepalantina, demonstrando que a presença de grupos volumosos atrapalha o aparecimento da atividade mutagênica.

As paepalantinas que tinham açúcares adicionados às suas estruturas básicas também foram avaliadas no teste de Ames e seus resultados demonstraram que ambas apresentaram mutagenicidade, mas que essa varia com a quantidade de açúcares que são adicionados na sua estrutura básica.

A atividade mutagênica das paepalantinas acetiladas não foi avaliada, pois havia uma quantidade muito limitada de massa para os ensaios biológicos.

5. Discussão

Dados da literatura apontam que moléculas obtidas de plantas, que são estruturalmente semelhantes ao estradiol (também chamados fitoestrógenos), podem atuar como interferentes endócrinos e podem ter alguns efeitos semelhantes ou contrários aos dessa molécula, e assim podem ser tanto benéficas quanto malélicas para o indivíduo que fizer uso dessas substâncias (COLIN et al., 2008; HAVSTEEN, 2002; PLISKOVA et al., 2005; VIEIRA et al., 2008; ZAND et al., 2002).

Os fitoestrógenos podem causar um desequilíbrio no sistema hormonal, e assim aumentar à propensão ao desenvolvimento de doenças relacionadas ao hormônio, como os cânceres estrógeno-dependentes, podendo causar também alguns distúrbios nos homens como diminuição na taxa de produção de espermatozóides e aparecimento de caracteres femininos (GHISELLI e JARDIM, 2007; SWAN et al., 2000; ZAND et al., 2002).

Embora alguns interferentes endócrinos apresentem papéis deletérios para o homem, existem relatos da literatura de que alguns fitoestrógenos demonstram ter potencial terapêutico e preventivo na ginecologia. Tem se visto recentemente que, com interesse na segurança, eles podem ser utilizados para substituir os estrógenos na terapia de reposição hormonal (HAYS et al., 2003). Esse interesse tem aumentado devido à percepção de que a terapia de reposição hormonal não é tão segura ou efetiva quanto se imaginava (HAYS et al., 2003). Além disso, a necessidade de achar compostos estrogênicos alternativos é evidenciada pela observação “*in vivo*” do risco de carcinogenicidade associada com a administração crônica de estradiol (YAGER e DAVIDSON, 2006).

Resultados de estudos epidemiológicos sugerem que a ingestão diária de alimentos contendo fitoestrógenos pode ter um papel protetor do câncer de mama e de outros cânceres hormônio-dependentes (ADLERCREUTZ, 2002, 2003; ZAND et al., 2002). É bem estabelecido, entretanto, que fitoestrógenos pertencem a diferentes classes de compostos, portanto, estruturas químicas sozinhas não são suficientes para predizerem a atividade

estrogênica. Por essa razão, investigações químicas guiadas por ensaios biológicos podem acrescentar importantes informações adicionais a respeito da atividade estrogênica de plantas.

É conhecido que o consumo de fitoestrógenos da soja (Figura 40 B-D) por mulheres na fase da menopausa traz benefícios à saúde dessas mulheres e que eles são uma interessante alternativa para combater os sintomas e conseqüências da menopausa (KINJO et al., 2004; VIEIRA et al., 2008). Podemos observar através da Figura 40 (letras E e F) a grande semelhança estrutural entre as isoflavonas da soja e a molécula do estradiol, o hormônio natural.

Portanto, a busca por fitoestrógenos torna-se interessante não somente no intuito de se avaliar o risco do uso de produtos naturais, mas também para se ter alternativas às terapias de reposição hormonal existentes.

Dentro do propósito da contribuição para a busca de fitoestrógenos, avaliou-se a estrogenicidade de três espécies da família Eriocaulaceae, *E. ligulatum*, *L. flavescens* e *L. spiralis* e mais oito substâncias isoladas (isocumarinas) de outras três espécies de plantas da mesma família Eriocaulaceae (*Paepalanthus vellozioides*, *P. bromelioides* e *P. planifolius*) foram escolhidas para fazer uma melhor comparação entre as atividades estrogênica e mutagênica e a composição química das plantas.

Para a avaliação do potencial estrogênico utilizou-se o teste RYA. Esse teste avalia a presença de substâncias capazes de interferir no funcionamento normal do sistema endócrino, os interferentes endócrinos (GARCIA-REYERO et al., 2005).

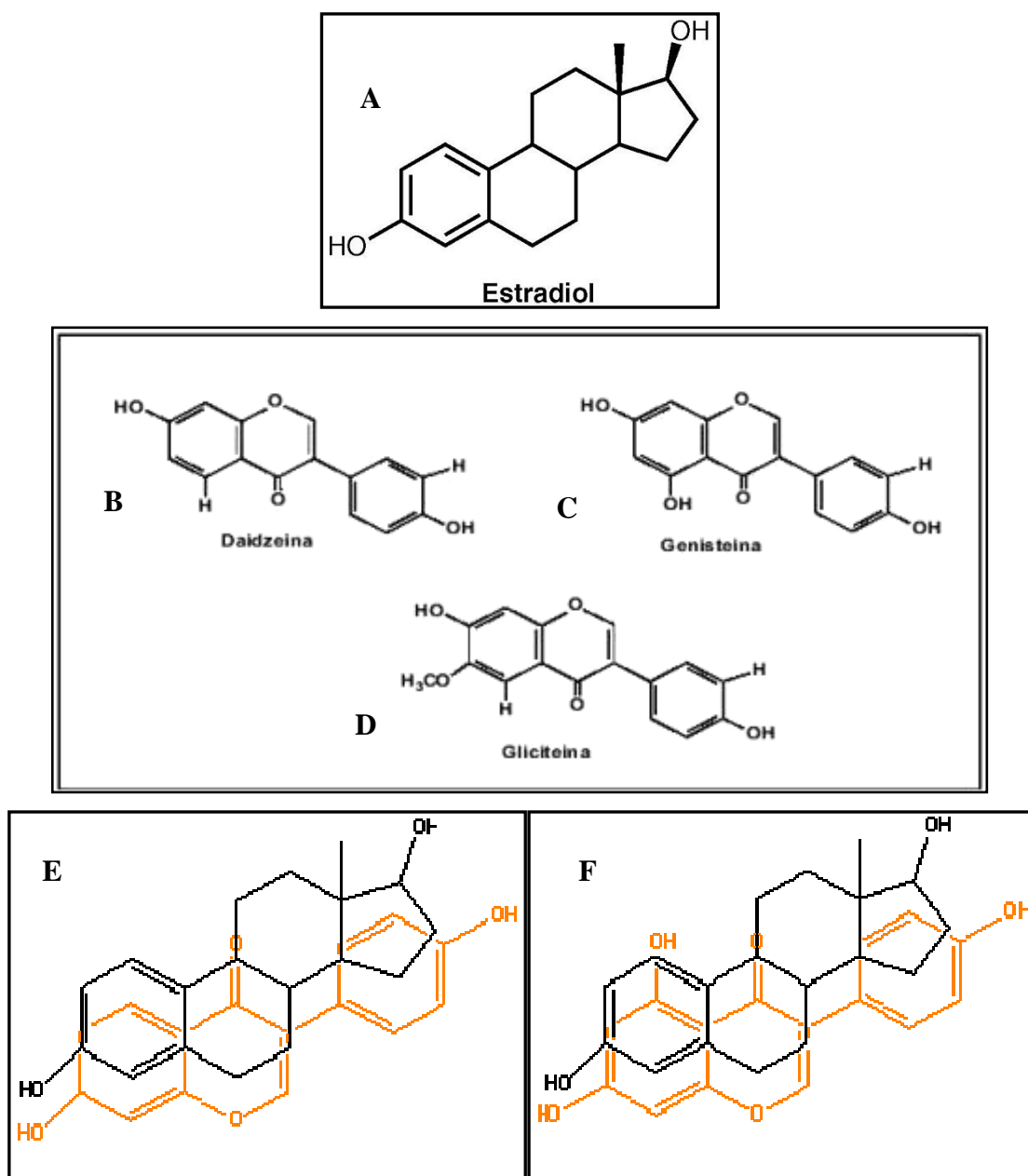


Figura 40. A) Estrutura do estradiol; Exemplos de fitoestrógenos isolados da soja: B) Daidzeína; C) Genisteína; D) Gliciteína; Comparação dos fitoestrógenos da soja com a estrutura do estradiol: E) Daidzeína e F) Genisteína.

Verificou-se, através dos ensaios de estrogénicidade, que a espécie *E. ligulatum* apenas apresentou resultados positivos para o teste RYA em uma de suas frações enriquecidas, a de flavonóides agliconas (FAI), mas as suas substâncias isoladas não apresentaram potencial estrogénico, nem mesmo a substância **E.I. 4**, que está na forma de aglicona.

A espécie *L. flavescens*, que forneceu 2 flavonas na forma de agliconas, a luteolina (**L.f. 1**) e a 6-metoxiluteolina (**L.f. 2**), apresentou estrogenicidade positiva.

Dados da literatura apontam para a estrogenicidade de flavonóides agliconas, principalmente os pertencentes às classes de isoflavonas e flavonas (CHOI et al., 2000; KINJO et al., 2004; VIEIRA et al., 2008). A capacidade estrogênica dessas substâncias está relacionada à sua semelhança estrutural com o estradiol.

Da espécie *L. spiralis* foram avaliados apenas seus extratos, e para esses não foi evidenciada nenhuma atividade estrogênica. As substâncias isoladas dessa espécie não foram avaliadas e por essa razão a sua relação estrutura-atividade estrogênica não pode ser realizada.

Para o estabelecimento da relação estrutura-atividade estrogênica das substâncias isoladas da família Eriocaulaceae, avaliou-se primeiramente a sua atividade estrogênica, através do teste RYA, e essa atividade foi relacionada aos seus dados estruturais.

Verificou-se que as três espécies de Eriocaulaceae avaliadas forneceram principalmente dois tipos de substâncias isoladas, flavonóides e isocumarinas. Pode-se, portanto, com isso, estabelecer a relação estrutura-atividade estrogênica para as substâncias isoladas da Família Eriocaulaceae e comparar essa com dados da literatura (APPENDINO et al., 2002; CHOI et al., 2008; HUBBARD et al., 2000; KINJO et al., 2004; MORITO et al., 2002; XIN, 2009).

O mecanismo de interação de interferentes endócrinos com o receptor de estrógeno foi descrito por Hubbard et al. (2000), onde são verificadas as características necessárias para que haja essa interação e as características que a prejudicam. O centro receptor de estrógeno é constituído de uma cavidade hidrofóbica, a qual reconhece uma variedade de compostos estruturalmente distintos. O reconhecimento é alcançado através da combinação de ligações de hidrogênio específicas e da complementariedade de resíduos hidrofóbicos que recobrem a cavidade do receptor com a natureza apolar dos ligantes. De acordo com essas características,

provavelmente moléculas que apresentem hidroxilas livres, em posições estratégicas, e núcleos esteroidais como os do estradiol, apresentarão afinidade com o receptor de estrógeno e conseqüentemente, atividade estrogênica.

A relação estrutura-atividade estrogênica dos flavonóides foi avaliada e, comparando as estruturas dos quatro flavonóides isolados de *E. ligulatum* (**E.I. 1** a **E.I. 4**) com a estrutura do 17- β -estradiol, verificamos que dos quatro, três apresentam açúcares adicionados às suas estruturas básicas e que todos apresentam o radical metoxila no anel A, com isso podemos concluir que a adição de açúcares e a metoxilação do anel A prejudicam o aparecimento da estrogenicidade o que pode explicar os dados negativos encontrados para a espécie *E. ligulatum*. Dos 4 flavonóides, apenas o **E.I. 4** está na sua forma aglicona, e não apresenta açúcar na sua estrutura básica, mas como contém uma metoxilação no anel A, teve seu potencial estrogênico negativo.

Os resultados negativos encontrados para os flavonóides isolados de *E. ligulatum* são confirmados por outros pesquisadores que também fizeram um estudo de relação estrutura-atividade estrogênica com flavonóides. Choi et al. (2008) verificaram que a substituição de grupos hidroxila por grupos metoxila em flavonóides reduzia a afinidade de ligação com o receptor de estrógeno, indicando, portanto, que os grupos hidroxila são cruciais para a atividade de ligação.

Os mesmos autores estudaram a afinidade de flavonas de se ligar ao receptor de estrógeno e verificaram que elas apresentaram atividades estrogênicas fracas, mas que podiam atuar como fitoestrógenos. Eles compararam a atividade estrogênica de flavonas com a de isoflavonas e avaliaram os seus aspectos estruturais, pois elas apresentam similaridades estruturais. Viram que apesar da apigenina ter um anel bifenil que contém grupos hidroxilas nas posições 5 e 7, assim como a genisteína, a posição do anel B ligado ao anel C é diferente e essa diferença estrutural demonstrou diminuir a atividade estrogênica.

Em relação à espécie *L. flavescens*, pudemos observar que a estrogenicidade foi positiva. Suas flavonas estão na forma aglicona (Figura 41) e apresentam hidroxilas nas posições 5 (A) e 3' (B), o que pode estar favorecendo o aparecimento do potencial estrogênico, pois essas hidroxilas correspondem respectivamente às hidroxilas 3 (A') e 17' (B') do 17- β -estradiol. Os flavonóides isolados de *E. ligulatum*, **E.I. 1** e **E.I. 2**, que foram negativos, apresentam açúcares no lugar da hidroxila na posição 7.

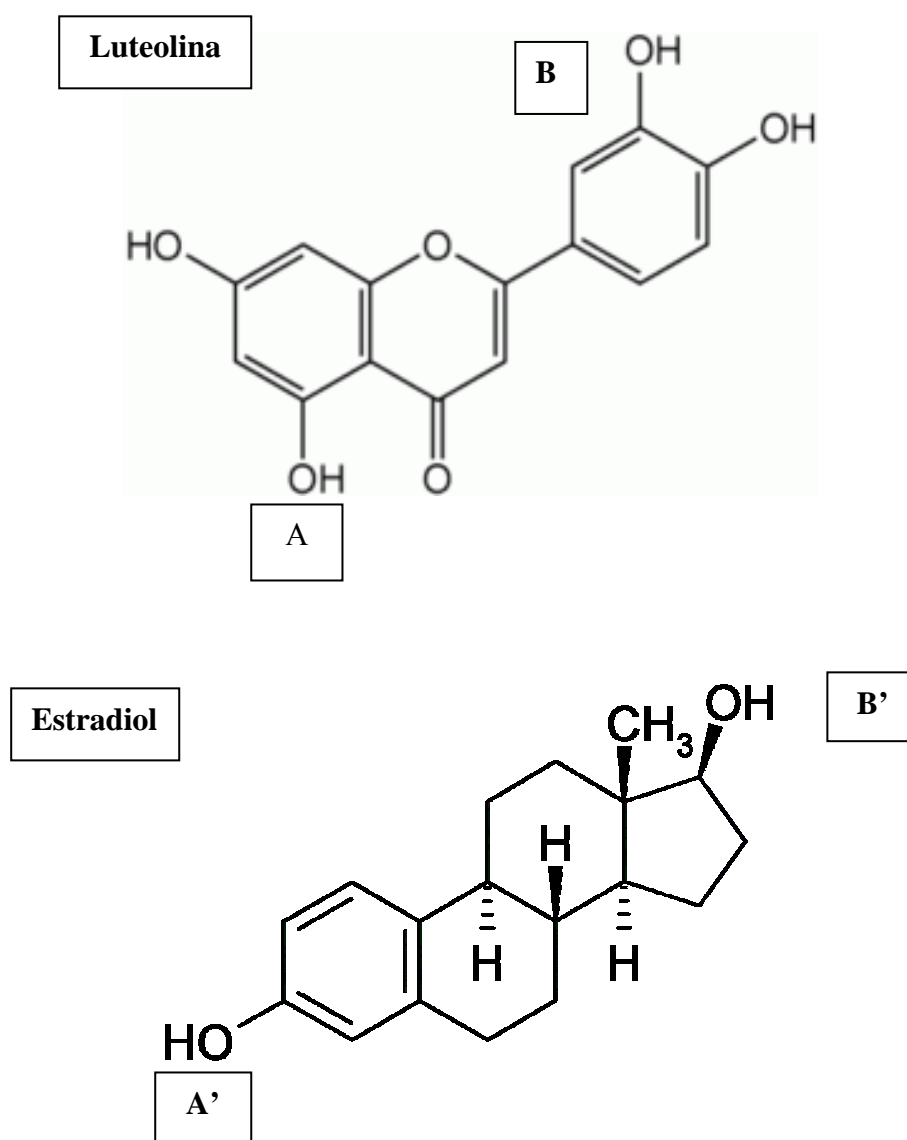


Figura 41. Comparação entre as hidroxilas das moléculas do estradiol e de luteolina.

Morito et al. (2002) avaliaram a interação de um flavonóide, chamado de coumestrol, com os receptores de estrógenos α e β . Eles viram que uma característica que contribuía para a forte ligação do coumestrol com os receptores de estrógeno era a presença de um grupo carbonila na posição 2 e uma ponte de éter entre as posições 2' e 4. Essa ponte induz uma estrutura plana e aumenta a similaridade com o 17- β - estradiol.

Os mesmos autores verificaram que a análise por raios-X da ligação do receptor β com a genisteína sugere que a hidroxila da posição 7 corresponde à hidroxila da posição 3 do 17- β - estradiol e a hidroxila da posição 4' corresponde à hidroxila da posição 17 do hormônio. Viram também que a metoxilação e a glicosilação desses sítios geralmente enfraquece a ligação com os receptores de estrógeno e a indução de expressão gênica.

Choi et al. (2008) avaliaram a atividade estrogênica de duas isoflavonas da soja, daidzeína e genisteína. Verificaram que a genisteína é mais estrogênica do que a daidzeína e que isso indica que uma hidroxila a mais na posição 5 aumenta a estrogenicidade. Essa informação é confirmada por outros dois estudos realizados por Fang et al. (2001) e Miksicek (1994).

Para um conhecimento mais preciso entre a estrutura e a estrogenicidade, Choi et al. (2008) também compararam 10 tipos de isoflavonas. A gliciteína, que possui grupos hidroxilas nas posições 4' e 7, como a genisteína e a daidzeína, também possui um grupo metoxila na posição 6, que se encontra em uma orientação orto com a hidroxila da posição 7 no anel A. A atividade estrogênica da gliciteína em termos de afinidade de ligação com o receptor de estrógeno é muito similar à da daidzeína, portanto, possui uma atividade menor que a genisteína. Um análogo da gliciteína, com hidroxilas orto-substituídas, a 4',6,7-trihidroxiisoflavona, teve a sua ligação com o receptor de estrógeno e a proliferação celular no teste E-screen reduzidas. Já a 3',4',7-trihidroxiisoflavona, um análogo da daidzeína com uma

hidroxila na posição 3, não apresentou estrogenicidade. Isso indica que a orientação orto entre dois grupos hidroxilas podem servir para reduzir a estrogenicidade.

Dos flavonóides avaliados neste trabalho, a luteolina (**L.f. 1**) e a 6-metoxiluteolina (**L.f. 2**) apresentam características estruturais muito semelhantes às verificadas na genisteína, as quais favoreceram a sua interação com o receptor de estrógeno, e isso explica porque essas flavonas foram as que apresentaram os melhores resultados no teste RYA.

Xin et al. (2009) avaliaram duas cumarinas, psoraleno e isopsoraleno, isoladas de *Psoralea corylifolia* L., uma planta da medicina tradicional chinesa usada para cólicas menstruais. Eles viram através de um ensaio com genes repórteres que essas duas cumarinas atuam como agonistas seletivos do receptor alfa. Neste trabalho foram avaliadas isocumarinas isoladas da família Eriocaulaceae através do teste RYA, que utiliza leveduras *Saccharomyces cerevisiae* que expressam também o receptor de estrógeno alfa, e verificou-se que algumas delas também foram positivas, portanto podem ser agonistas do receptor alfa.

De todas as isocumarinas da família Eriocaulaceae avaliadas, apenas as que tiveram pequenas modificações, como adição de açúcares e acetilações na sua estrutura básica, apresentaram resultados positivos.

Para duas isocumarinas que estavam em forma de dímero (como a eriocaulina e o dímero 8-8' da paepalantina) os resultados foram negativos. Esses resultados provavelmente se devem à presença de grupos muito volumosos adicionados à sua estrutura básica.

Alguns autores verificaram que a presença de grupos muito volumosos na cadeia lateral de moléculas com atividade estrogênica prejudicava a sua entrada na levedura e a correta interação com o receptor (HUBBARD et al., 2000; PIKE, 2006).

A exceção foi o dímero planifolina, que apresentou resultados positivos no teste RYA, provavelmente porque sua conformação espacial não desfavoreceu tanto a sua permeabilidade e a sua correta interação com o receptor de estrógeno, pois se trata de uma molécula em que

seus monômeros estão dispostos mais próximos, conectados por uma ligação 10 e 9', e deixam a molécula um pouco menor em relação ao tamanho dos outros dímeros.

Em relação às paepalantinas com pequenas modificações na sua estrutura básica, observou-se que a adição de 1 açúcar favoreceu o aparecimento de estrogenicidade, mas que essa foi drasticamente diminuída quando houve a adição de uma molécula adicional de açúcar à estrutura básica, provavelmente porque houve um prejuízo na interação com o receptor de estrógeno devido à presença de um grupo volumoso adicionado à molécula.

Alguns autores verificaram que a glicosilação mostrou ser uma metodologia muito útil para aumentar a biodistribuição no cérebro. Uma maior analgesia foi reportada para o deltorfin glicosilado (NEGRI et al., 1999; TOMATIS et al., 1997), para análogos cíclicos da met-enkefalina (EGLETON et al., 2000; POLT et al., 1994) e para análogos lineares da leu-enkefalina (BILSKY et al., 2000). Moléculas que continham açúcares diferentes, incluindo a glicose e a xilose, foram investigadas e viram que seus respectivos açúcares favoreciam a permeabilidade da barreira hematoencefálica (EGLETON et al., 2000).

Em relação à acetilação, pudemos verificar que a mudança de posição do radical acetil modifica a permeabilidade e possivelmente a interação da paepalantina com o receptor. Quando o radical foi adicionado na posição 5, foram utilizadas apenas 1,15 µg para se obter uma atividade estrogênica estatisticamente significativa em relação ao controle negativo (11%). Quando esse radical foi mudado para a posição 6, para se obter praticamente o mesmo efeito (14%), foram utilizadas 21,8 µg. E para obter o mesmo efeito com a paepalantina que tinha o radical acetil adicionado na posição 7, foram necessárias 61,5 µg. Isso provavelmente está acontecendo, pois o radical acetil, apesar de ter favorecido a permeabilidade do composto que o tinha na posição 5, na posição 7 fica mais lateral e dificulta um pouco a permeabilidade e a interação com o receptor.

O mecanismo de acetilação de compostos é bastante utilizado para aumentar a sua permeabilidade através da membrana plasmática. Um forte exemplo de aumento da permeabilidade é a acetilação de grupos hidroxilas da morfina, que dá origem à heroína, um composto 100 vezes mais permeável (OLDENDORF et al., 1972).

Hermoso et al. (2003) verificaram que a substituição de grupos hidroxilas por grupos acetato não somente aumentava a atividade antileishmania, mas também diminuía a citotoxicidade em macrófagos. Então, viram que a atividade de derivados mono, di e triacetilados eram, respectivamente, 2, 7 e 8 vezes maiores que a atividade do padrão, e que a citotoxicidade foi fortemente reduzida.

Esses dados são concordantes com os resultados encontrados neste estudo. Acredita-se que o aumento da permeabilidade da molécula da paepalantina, e conseqüentemente o aparecimento da sua atividade estrogênica, seja devido principalmente à sua acetilação.

Embora muitos compostos de origem vegetal demonstrem ter considerável atividade farmacológica, algumas propriedades indesejáveis, como mutagenicidade, carcinogenicidade e toxicidade, podem restringir seu uso como agentes terapêuticos (SIMÕES et al., 1999).

Os extratos metanólico e diclorometânico de *E. ligulatum* foram avaliados quanto ao seu potencial mutagênico no teste de Ames e observou-se que seus resultados foram muito expressivos (DA SILVA et al., 2007). A partir desses dados e para elucidar melhor os mecanismos pelos quais essa mutagenicidade acontecia e, com isso, avaliar melhor o risco do uso dessas substâncias, procedeu-se à avaliação da mutagenicidade dessa espécie através da investigação do potencial mutagênico de suas frações enriquecidas e suas substâncias isoladas. Foi também iniciada a avaliação da atividade mutagênica de mais algumas espécies da família Eriocaulaceae para que uma comparação entre as suas diferentes composições químicas e seus resultados de mutagenicidade pudesse ser feita. Então, através do teste de

Ames, a atividade mutagênica das espécies *E. ligulatum*, *L. flavescens*, *L. spiralis* foi estudada.

Em relação aos dados de avaliação da mutagenicidade de flavonóides, podemos observar hoje que a literatura é vasta. Há um interesse muito grande na avaliação da toxicidade genética de alguns flavonóides e essa tem sido avaliada em diversas plantas medicinais. Certos flavonóides são genotóxicos enquanto outros inibem a mutagenicidade e carcinogenicidade de outros mutágenos (BOUHLEL et al., 2009; KAUR et al., 2009; LIN et al., 2009; NAJAFZDEH et al., 2009; OGURA et al., 2008; PUGALENDHI et al., 2009; TAKUMI-KOBAYASHI et al., 2008; UTESCH et al., 2008; ZHANATAEV et al., 2008).

Além de um crescente interesse na avaliação da mutagenicidade de muitos flavonóides conhecidos, através do teste de Ames, alguns pesquisadores estabeleceram a relação estrutura-atividade de certos flavonóides que apresentaram mutagenicidade positiva no teste de reversão com *Salmonella typhimurium* (CZECZOT et al., 1990; EDENHARDER et al., 1993; MACGREGOR e JURD, 1978; NAGAO et al., 1981 e SANDNESS et al., 1992).

Uma comparação entre a estrutura dos flavonóides, estudados por Czczot et al. (1990), com sua atividade mutagênica indica que a mutagenicidade dos flavonóides é dependente da presença de grupos hidroxila nas posições 3' e 4' no anel B (Figura 42), e que a presença de uma hidroxila livre ou um grupo metoxila na posição 7 no anel A, também contribui para o aparecimento de atividade mutagênica no teste de Ames. Parece que a presença de metoxilas, particularmente no anel B da molécula do flavonóide, reduz drasticamente a atividade mutagênica da substância.

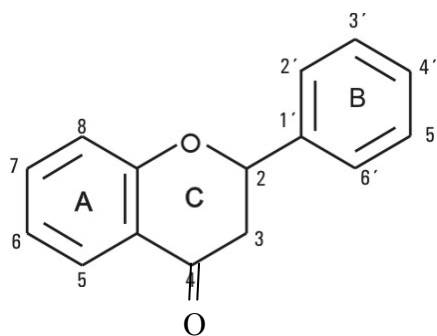


Figura 42. Estrutura básica dos flavonóides.

Nagao et al. (1981) avaliaram a mutagenicidade dos flavonóides e relacionaram os resultados obtidos às estruturas desses flavonóides. Para um flavonóide exercer uma atividade mutagênica forte, esse deve possuir uma dupla ligação entre os carbonos 2 e 3 do anel C e um grupo hidroxila na posição 3 do mesmo anel.

Todos os flavonóides estudados neste trabalho apresentam uma dupla ligação entre as posições 2 e 3, o que explica, segundo Nagao et al. (1981), a mutagenicidade encontrada desses compostos.

O flavonóide **E.I. 3** é uma molécula *O*-glicosilada, cujo açúcar está adicionado na posição 3 do anel C e sua mutagenicidade foi considerada negativa na ausência de metabolização. Mas, na presença de metabolização, quando provavelmente esse açúcar foi removido e a hidroxila da posição 3 foi restaurada, houve o aparecimento da mutagenicidade.

De todos os flavonóides isolados avaliados neste trabalho, somente **E.I. 1** e **E.I. 2** apresentam açúcares na posição 7 do anel A e não foram mutagênicos na ausência de metabolização. Quando a metabolização foi empregada, foi verificada uma mutagenicidade positiva para ambas as substâncias, provavelmente porque os açúcares foram removidos e a hidroxila foi restaurada, a qual, segundo Czczot et al. (1990), favorece o aparecimento de atividade mutagênica.

O flavonóide **E.I. 4**, que está na forma de aglicona e, portanto, não possui açúcares anexos a sua estrutura, foi o único flavonóide que apresentou, mesmo que em menor grau, mutagenicidade sem metabolização.

Foi verificado que o tipo de açúcar adicionado não interfere na atividade mutagênica, pois o flavonóide **E.I. 1** contém uma glicose adicionada à sua estrutura básica e o flavonóide **E.I. 2** contém uma alose, e ambos foram negativos para o teste de Ames em ausência de metabolização.

Já a mudança de posição de um açúcar na estrutura básica dos flavonóides mostrou ser um fator determinante para a atividade mutagênica. Verificou-se que o **E.I. 1**, que tem uma glicose adicionada na posição 7, as concentrações no teste de Ames variaram de 29,6 a 355,5 µg/ placa e para o **E.I. 3**, que tem o mesmo açúcar adicionado na posição 3, utilizou-se 3 vezes menos, 8 a 98 µg/ placa. Essa diferença na quantidade utilizada para exercer o mesmo efeito, demonstra que o flavonóide **E.I. 3** é mais potente que o **E.I. 1**, que a glicosilação na posição 7 desfavorece mais o aparecimento de mutagenicidade do que a mesma na posição 3.

Os flavonóides avaliados neste ensaio foram mais mutagênicos na presença de metabolização, possivelmente pelo mesmo mecanismo elucidado por Sandness et al. (1992) que avaliaram a mutagenicidade de alguns flavonóides glicosilados do extrato de Senna, através do teste de Ames, e verificaram que esses foram inativos em todas as linhagens testadas (TA100, TA98, TA97a e TA102), mas quando esses flavonóides foram expostos à hidrólise enzimática com a hesperidinase dos extratos dos frutos de Senna, a atividade mutagênica foi aumentada e isso pode ser relacionado com a liberação dos flavonóis, kaempferol e quercetina, em forma de aglicona.

Em outro estudo, que avaliou a mutagenicidade de flavonóides glicosilados e de agliconas, verificou-se que 6 flavonóis glicosilados (3 derivados da quercetinas e 3 derivados do kaempferol glicosilados) foram mutagênicos após pré-incubação com “hesperidinase” e

também verificou que dentre os 61 flavonóides agliconas estudados, a aglicona da quercetina foi o composto mutagênico mais potente (NAGAO et al., 1981).

Tamura et al. (1981) verificaram também que flavonóides glicosilados tinham a sua porção açúcar hidrolisada por enzimas, as β -glicosidades, do trato digestivo e que isso resultava na liberação da forma aglicona no intestino.

Em relação às espécies de *Leiothrix* avaliadas no teste de Ames, foi verificado que nenhuma das duas apresentou resultados positivos. Esse resultado negativo pode ser devido à ausência de isocumarinas neste gênero, pela presença de flavonóides C-glicosilados e pelo sinergismo que ocorre naturalmente em misturas complexas como extratos de plantas (SANTOS et al., 2001b). Essa ligação entre o carbono do flavonóide e o açúcar é mais difícil de ser rompida do que a que ocorre em flavonóides O-glicosilados. Esses últimos estão presentes em grande quantidade na espécie *E. ligulatum*, que apresentou resultados positivos, após o emprego da metabolização. Esses dados afirmam a teoria de que provavelmente os açúcares, que dificultam a interação com o DNA e conseqüentemente o aparecimento da mutagenicidade dos flavonóides, sejam liberados quando há o emprego das enzimas metabolizadoras.

A mesma preocupação com o risco humano de exposição aos flavonóides que podem possuir atividades genotóxica e/ou mutagênica ocorre com as isocumarinas. As isocumarinas compreendem uma classe de produtos naturais polifenólicos presentes numa variedade de espécies de plantas (HILL, 1986), indicando muitas atividades farmacológicas, incluindo ação antitumoral (CAÑEDO et al., 1997; DEVIENNE et al., 2005 e 2002; DI STASI et al., 2004; KOSTOVA, 2005 e OKAMOTO et al., 2005). Pertencem a uma classe de compostos naturais que diferem um do outro nos grupos laterais ligados à estrutura básica, como OH, OMe, OAc, COOH e açúcar, que podem interferir diretamente na atividade biológica desses compostos.

A paepalantina, uma isocumarina, e seus derivados, isolados do extrato de *Paepalanthus vellozoides* e de *P. bromelioides*, apresentaram atividade antimicrobiana, mutagênica e citotóxica e foram investigados quanto à indução de mutações nas linhagens TA97a, TA98, TA100 e TA102 de *Salmonella typhimurium* (VARANDA et al., 1997, 2004). No estudo feito por Varanda et al. (2004), foram avaliadas as atividades mutagênicas de 3 isocumarinas derivadas da paepalantina e foi verificado que uma das isocumarinas (isocumarina 2 : paepalantina-9-O- β -D-glucopiranosídeo) apresentou atividade mutagênica na linhagem TA97a, em presença de metabolização e que outra isocumarina (isocumarina 3: paepalantina-9-O- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-alopiranosídeo) apresentou indícios de mutagenicidade na linhagem TA102, em presença de metabolização e na linhagem TA97a, na presença e na ausência de metabolização.

Ainda segundo Varanda et al. (2004), foi verificado que a capacidade dos grupos nas posições 1, 9 e 10 (Figura 43) da paepalantina formarem ligações de hidrogênio com o nitrogênio das bases do DNA explica a atividade mutagênica dessa isocumarina. A molécula da paepalantina apresenta um átomo de hidrogênio no local do radical R₁, o que deixa uma hidroxila livre, responsável pela atividade mutagênica encontrada, na posição 9.

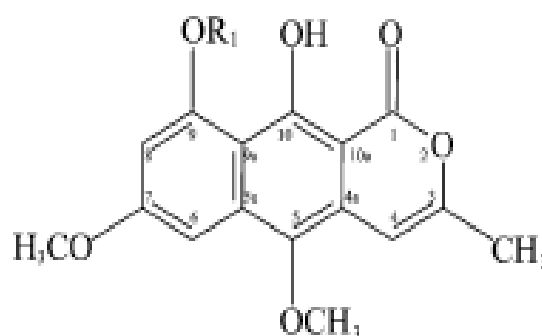


Figura 43. Estrutura básica das isocumarinas.

A potência mutagênica das isocumarinas da família Eriocaulaceae foi avaliada (Tabela 44) e essa pode ser definida pela capacidade que um composto tem de reverter um número

determinado de mutações por unidade de massa utilizada no ensaio. Verificou-se que a paepalantina apresentou uma potência mutagênica muito alta, principalmente na linhagem TA97a. Ela foi capaz de reverter 1809,2 mutações por μg , na ausência de metabolização (-S9), demonstrando que a paepalantina age principalmente como um mutágeno direto, pelo mecanismo de deslocamento do quadro de leitura.

Tabela 44. Atividade mutagênica expressa pela potência (número de revertentes/ μg) em linhagens de *S. typhimurium* expostas a substâncias isoladas de extratos de plantas da família Eriocaulaceae, na ausência (-S9) e na presença (+S9) de metabolização.

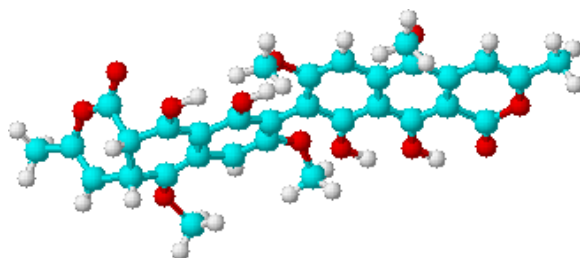
Potência Mutagênica em linhagens de <i>S. typhimurium</i>								
Substâncias	TA 100		TA 98		TA 97a		TA 102	
	- S9	+ S9	- S9	+ S9	- S9	+ S9	- S9	+ S9
Paepalantina	27,3	23,8	9,4	4,9	1809,2	786,1	-	156,6
Dímero 8-8' da paepalantina	-	-	-	-	-	-	-	-
Planifolina	42,5	31,3	2,19	13,2	-	371,2	-	-
Eriocaulina	ND	ND	ND	ND	443,0	50,8	-	17,5

- : resultado negativo; **ND**: não determinado.

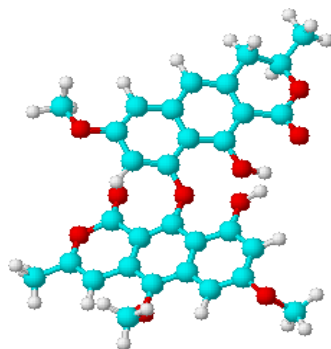
A eriocaulina (**E.I. 5**) é um dímero da paepalantina e possui também uma hidroxila livre na posição 9 e uma outra hidroxila na posição 9' e isso pode favorecer ainda mais a formação de pontes de hidrogênio com as bases do DNA e muito possivelmente explica o grande potencial mutagênico encontrado nesse composto, na ausência de metabolização. Esse dímero apresentou mutagenicidade positiva na linhagem TA97a assim como a paepalantina, mas com uma menor potência mutagênica (443.0/ μg). Isso muito provavelmente se deve ao fato de ela ser um grupo mais volumoso, e que teria mais dificuldade para interagir com as bases do DNA. O mesmo acontece com os outros dímeros da paepalantina, a planifolina e o

seu dímero 8-8'. Ambas são moléculas volumosas, que têm uma conformação espacial que impede de interagir corretamente com o DNA.

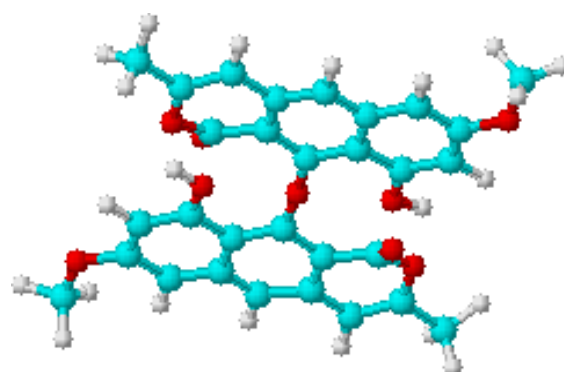
Comparando-se as conformações espaciais desses 3 dímeros (Figura 44), pertencentes à família Eriocaulaceae, foi possível clarear mais a sua relação estrutura-atividade. A eriocaulina é uma molécula angular, que possui as suas hidroxilas livres, das posições 9 e 9', suficiente afastadas do plano do monômero oposto, o que facilita a sua ligação com o DNA e explica o tipo de mutações que essa molécula gerou (por deslocamento de quadro de leitura), identificado pela linhagem TA97a, na ausência de metabolização.



Dímero 8-8' da paepalantina



planifolina



eriocaulina

Figura 44. Estruturas dos dímeros da psoralantina em 3D.

Um mecanismo descrito por Dewick (1997) pode explicar ainda mais o tipo de mutações que a eriocaulina gerou e que foram identificadas pela TA97a. Ele verificou que anéis furanos e piranos de uma cumarina, o psoraleno, intercalavam no DNA. O mecanismo envolve uma relação de cicloadição, iniciada por luz ultravioleta, entre uma pirimidina e o anel furano dos psoralenos. Em alguns casos, di-adtuctos podem ser formados através de uma reação adicional de cicloadição via anel pirano do psoraleno. Essa reação de intercalação inibe a replicação do DNA e reduz a taxa de divisão celular. A molécula da eriocaulina também apresenta um anel pirano e a sua interação com a base do DNA, pelo mesmo mecanismo dos psoralenos, pode explicar as mutações geradas no teste de Ames.

A planifolina é uma molécula muito angular, que possui hidroxilas livres nas posições 10 e 9', mas essas hidroxilas se encontram muito próximas do plano do monômero oposto, o que pode dificultar ou até impedir a interação com as bases do DNA. Sua mutagenicidade foi considerada positiva principalmente na linhagem TA97a, mas somente na presença de metabolização (VARANDA et al., 2006), provavelmente porque os monômeros tenham sido liberados.

Esse dímero demonstrou ter a capacidade de interagir com as bases do DNA, pelo mecanismo de deslocamento de quadro principalmente, mas com menor potência que as duas

isocumarinas anteriores, 371.2/ μg . Isso demonstra que a conformação em que esse dímero se encontra está desfavorecendo o aparecimento de atividade mutagênica, mais do que a conformação dimérica atrapalha a mutagenicidade na eriocaulina.

A ligação C-O-C que essa molécula possui está presente entre os seus monômeros, e é uma ligação mais fácil de ser quebrada e assim seriam liberadas duas naftopiranonas que possuem atividade mutagênica comprovada: uma semi-vioxantina e uma paepalantina (DEVIENNE et al., 2007). Ambas as moléculas, depois de liberadas, possuem hidroxilas livres e o potencial de ligação com as bases do DNA é aumentando, explicando, portanto a mutagenicidade encontrada somente após o emprego de metabolização.

O dímero 8-8' da paepalantina também é uma molécula angular, composta por duas paepalantinas ligadas pelas posições 8 e 8', mas apresentou mutagenicidade negativa para todas as linhagens testadas na ausência de metabolização (VARANDA et al., 2004). Esses resultados negativos provavelmente estão relacionados à conformação deste dímero, que está desfavorecendo ainda mais o aparecimento de mutagenicidade. Isso pode ser explicado, pois as suas hidroxilas estão muito próximas a grupos metoxila e isso pode estar causando um impedimento estérico. Pode estar ocorrendo também uma espécie de ressonância entre os radicais dessa molécula, devido a sua proximidade, o que explica a alta capacidade antioxidante dessa molécula (DEVIENNE et al., 2007). Esse dímero tem seus monômeros ligados por uma ligação C-C que é extremamente estável, que dificilmente irá se romper, o que impediria a liberação de seus monômeros, mesmo com o emprego de metabolização. Isso explica a mutagenicidade negativa encontrada mesmo depois do uso da mistura S9.

Em relação a adições de açúcares na molécula da paepalantina, verificou-se que quando uma molécula é adicionada, a atividade mutagênica é diminuída. Os resultados positivos da aglicona foram vistos em todas as linhagens testadas, mas após a adição de um açúcar, somente aparecem na linhagem TA97a e apenas na presença de metabolização.

Quando mais uma molécula de açúcar é adicionada, apenas indícios de mutagenicidade são vistos, e apenas na presença de metabolização, nas linhagens TA97a e TA102, demonstrando que a quantidade de açúcar interfere na atividade mutagênica.

As informações obtidas neste estudo sobre a atividade estrogênica, adicionadas às informações de mutagenicidade, demonstram que os melhores candidatos a medicamentos alternativos à reposição hormonal são as flavonas isoladas de *L. flavescens*, pois essas não foram positivas no teste de Ames e, portanto não são consideradas mutagênicas, e tiveram um bom potencial estrogênico, no teste RYA.

Com essa dupla avaliação, dos potenciais mutagênico e estrogênico de produtos obtidos de plantas adicionados à avaliação da relação estrutura-atividades mutagênica e estrogênica de algumas substâncias isoladas de plantas da família Eriocaulaceae, foi possível obter mais informações a respeito do risco do uso dessas substâncias, bem como contribuir para a busca de terapias alternativas à reposição hormonal e para um maior conhecimento sobre a família Eriocaulaceae.

6. Conclusões

➤ **Teste RYA:**

Os dados da avaliação da atividade estrogênica, através do teste RYA, permitiram concluir que:

- Das 31 amostras analisadas, apenas foram consideradas estrogênicas, para o teste RYA: a fração **FAI** (Flavonóides Agliconas + Isocumarinas) de *E. ligulatum*, as **frações 4 L.f.** (que contém flavonóides glicosilados) e **5 L.f.** (que contém flavonóides agliconas) de *L. flavescens*; as substâncias isoladas **L.f. 1** (luteolina) e **L.f. 2** (metoxiluteolina) de *L. flavescens*; a paepalantina monoheterosídica e as paepalantinas acetiladas nas posições 5, 6 e 7;
- A espécie *E. ligulatum* apenas apresentou resultados significativos para o teste RYA na sua fração de flavonóides agliconas + isocumarinas (**FAI**), portanto as suas substâncias isoladas não apresentam potencial estrogênico;
- A relação estrutura-atividade estrogênica para os flavonóides e para as isocumarinas isolados de Eriocaulaceae foi encontrada;
- Os flavonóides isolados de *E. ligulatum*, **E.I. 1** e **E.I. 2**, apresentam açúcares no lugar da hidroxila na posição 7, o que desfavorece o aparecimento do potencial estrogênico;
- A adição de açúcares e a metoxilação do anel A dos flavonóides prejudicam o aparecimento da estrogenicidade, como no caso da **E.I. 4**;
- Hidroxilas, presentes nas posições 7 e 4' de flavonas, favorecem o aparecimento do potencial estrogênico;
- Os flavonóides interagiram com mais facilidade com o receptor de estrógeno do que as isocumarinas;

- As isocumarinas agliconas das espécies da família Eriocaulaceae não apresentaram potencial estrogênico, mas quando o monômero sofreu modificações como adição de açúcares e acetilações, esse efeito foi observado. A exceção foi a isocumarina em forma de dímero, planifolina, que apresentou resultados estatisticamente significativos da sua primeira concentração, em relação ao controle negativo;
- O aparecimento do potencial estrogênico da planifolina muito provavelmente se deve a sua conformação espacial que não atrapalhou tanto a permeabilidade e a interação com o receptor de estrógeno, em relação aos outros dímeros da mesma família;
- A adição de açúcares e acetilações na estrutura básica de isocumarinas possivelmente favoreceram o aumento da permeabilidade desses compostos e conseqüentemente maior acesso ao receptor de estrógeno;
- As isocumarinas em forma de dímero (eriocaulina, dímero 8-8' da paepalantina e planifolina) não apresentaram estrogenicidade, pois grupos muito volumosos na cadeia lateral prejudicam a entrada na levedura e a correta interação com o receptor;
- Nas paepalantinas com pequenas modificações na sua estrutura básica, a adição de um açúcar favorece o aparecimento de estrogenicidade, mas que essa diminui quando há a adição de uma molécula adicional de açúcar à estrutura básica;
- A mudança de posição do radical acetil modifica a permeabilidade e possivelmente a interação da paepalantina com o receptor;
- Xantonas e o 1,3-diferuloilglicerol não possuem atividade estrogênica;

➤ **Teste de Ames:**

Em relação à atividade mutagênica, avaliada pelo teste de Ames, dos extratos, frações e substâncias isoladas de plantas da família Eriocaulaceae, podemos concluir que:

- Das 3 espécies analisadas neste estudo, apenas a *E. ligulatum* apresentou atividade mutagênica devido principalmente à presença de isocumarinas e de flavonóides agliconas;
- Os resultados de frações e substâncias isoladas da espécie *E. ligulatum* corroboram os dados obtidos dos extratos submetidos ao teste de Ames;
- A presença da **E.I. 5** nos extratos e frações de *E. ligulatum* contribuiu para o aparecimento de mutagenicidade;
- A relação estrutura-atividade mutagênica para os flavonóides e para as isocumarinas isolados de Eriocaulaceae foi encontrada;
- Açúcares provavelmente são liberados quando há o emprego de metabolização, com a liberação da forma aglicona da substância e isso favorece o aparecimento de mutagenicidade;
- Flavonóides, com açúcares adicionados à sua estrutura básica, têm sua atividade mutagênica diminuída, e essa não é alterada com a mudança do tipo de açúcar adicionado;
- A posição em que um tipo de açúcar está adicionado na estrutura básica dos flavonóides interfere na atividade mutagênica encontrada;
- A paepalantina age principalmente como um mutágeno direto, pelo mecanismo de deslocamento do quadro de leitura;
- A quantidade de açúcar adicionado à estrutura básica da paepalantina interfere na atividade mutagênica;

- A eriocaulina também age como um mutágeno direto, pelo mecanismo de deslocamento do quadro de leitura, mas apresentou uma potência mutagênica menor que a da paepalantina;
- Os dímeros de isocumarinas têm a sua mutagenicidade influenciada pela sua conformação espacial, pela presença de grupos hidroxilas mais afastados de grupos volumosos, e pelo tipo de ligação que une os seus monômeros.

➤ CONCLUSÃO GERAL

De acordo com os experimentos realizados, tanto para a avaliação do potencial estrogênico, quanto para o mutagênico, podemos considerar que os melhores candidatos a medicamentos alternativos à reposição hormonal são as flavonas isoladas de *L. flavescens*, pois essas não apresentaram mutagenicidade no teste de Ames e tiveram um bom potencial estrogênico, no teste RYA.

7. Referências Bibliográficas

- ADDAE-MENSAH, I. **Towards a rational scientific basis for herbal medicine, a phytochemists two-decade contribution.** Accra: Ghana Universities Press vii, 1992. 63p.
- ADLERCREUTZ, H. Phytoestrogens and breast cancer. **J. Steroid Biochem.**, v. 83, p. 113–118. June 2003.
- ADLERCREUTZ, H. Phyto-oestrogens and cancer. **The Lancet Oncology**, v. 3, n. 6, p. 364–373. 2002.
- AL-BARWANI, F. M.; ELTAYEB, E. A. Antifungal compounds from induced *Conium maculatum* L. plants. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 32, n. 12, p. 1097-1108. 2004.
- ALVES, C.; FLORES, L. C.; CERQUEIRA, T. S., TORALLES, M. B. P. Exposição ambiental a interferentes endócrinos com atividade estrogênica e sua associação com distúrbios puberais em crianças. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 23, n. 5, p. 1005-1014. 2007.
- AQUINO, S. **Efeitos da radiação gama no crescimento de *Aspergillus flavus* produtor de aflatoxinas e no emprego da técnica da reação em cadeia da Polimerase (pcr) em amostras de grãos de Milho inoculadas artificialmente.** 99f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2003.
- ANTCZAK, C.; VEACH, D. R.; RAMIREZ, C. N.; MINCHENKO, M. A.; SHUM, D.; CALDER, P. A.; FRATTINI, M. G.; CLARKSON, B.; DJABALLAH, H. Structure–activity relationships of 6-(2,6-dichlorophenyl)-8-methyl-2-(phenylamino) pyrido[2,3-d]pyrimidin-7-ones: Toward selective Abl inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 19, n. 24, p. 6872 - 6876. 2009.
- APPENDINO, G.; SPAGLIARDI, P.; CRAVOTTO, G.; POCOCCO, V.; MILLIGAN, S. Daucane Phytoestrogens: A Structure-Activity Study. **J. Nat. Prod.**, v. 65, n. 11, p. 1612-1615. 2002.
- BAE, E. A.; HAN, M. J.; CHOO, M. K.; PARK, S. Y.; KIM, D. H. Metabolism of 20(S)- and 20(R)-ginsenoside R-g3 by human intestinal bacteria and its relation to in vitro biological activities. **Biological Pharmaceutical Bulletin**, v. 25, n. 158, p. 58–63. 2002.
- BANERJI, A. Biotechnical potential of natural products. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**, v. 27, n. 2, p. 105-113. 1992.
- BASSO, L. A.; SILVA, L. H. P.; FETT-NETO, A. G.; JUNIOR, W. F. A.; MOREIRA, I. S.; PALMA, M. S.; CALIXTO, J. B.; FILHO, S. A.; SANTOS, R. R.; SOARES, M. B. P.; SANTOS, D. S. The use of biodiversity as source of new chemical entities against defined molecular targets for treatment of malaria, tuberculosis, and T-cell mediated diseases – a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 6, p. 575-606, 2005.

BATISTA, L. M.; DE ALMEIDA, A. B.; DE PIETRO-MAGRI, L.; TOMA, W.; CALVO, T. R.; VILEGAS, W.; SOUZA-BRITO, A. R. Gastric antiulcer activity of *Syngonanthus arthrotrichus* SILVEIRA. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 27, n.3, p. 328-332. 2004.

BATRES-MARQUEZ, S. P.; JENSEN, H. H.; UPTON, J. Rice consumption in the United States: recent evidence from food consumption surveys. **J. Am. Diet. Assoc.**, v. 109, n. 10, p. 1719-1727. 2009.

BECK, V.; ROHR, U.; JUNGBAUER, A. Phytoestrogens derived from red clover: an alternative to estrogen replacement therapy. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 94, n. 5, p. 499–518. 2005.

BENASSAYAG, C.; PERROT-APPALANAT, M.; FERRE, F. Phytoestrogens as modulators of steroid action in target cells. **Journal of Chromatography**, v. 777, n. 1-2, p. 233-248. 2002.

BERNSTEIN, L.; KALDOR, J.; MCCANN, J.; PIKE, M. C. An empirical approach to the statistical analysis of mutagenesis data from the *Salmonella* test. **Mutation Research**, v. 97, n. 4, p. 267-281. 1982.

BILSKY, E. J.; EGLETON, R. D.; MITCHELL, S. A.; PALIAN, M. M.; DAVIS, P.; HUBER, J. D.; JONES, H.; YAMAMURA, H. I.; JANDERS, J.; DAVIS, T. P.; PORRECA, F.; HRUBY, V. J.; POLT, R. Enkephalin glycopeptide analogues produce analgesia with reduced dependence liability. **J. Med. Chem.**, v. 43, n.13, p. 2586–2590. 2000.

BONGARD, M. Essai Monographique sur les espèces d' *Eriocaulon* do Brésil. **Zap. Imp. Akad. Nauk.**, v. 6, n. 1, p. 601-655, 1831.

BOUHLEL, I.; SKANDRANI, I.; NEFATTI, A.; VALENTI, K.; GHEDIRA, K.; MARIOTTE, A. M.; HININGER-FAVIER, I.; LAPORTE, F.; DIJOUX-FRANCA, M. G.; CHEKIR-GHEDIRA, L. Antigenotoxic and antioxidant activities of isorhamnetin 3-O-neohesperidoside from *Acacia salicina*. **Drug Chem. Toxicol.**, v. 32, n. 3, p. 258-67. 2009.

BREINHOLT, V.; LARSEN, J. C. Detection of weak estrogenic flavonoids using a recombinant yeast strain and a modified MCF7 cell proliferation assay. **Chemical Research in Toxicology**, v. 11, n. 6, p. 622-629. 1998.

CAI, Y.; SUN, M.; XING, J.; LUO, Q.; CORKE, H. Structure–radical scavenging activity relationships of phenolic compounds from traditional Chinese medicinal plants. **Life Sciences**, v. 78, p. 2872–2888. 2006.

CÁLGARO-HELENA, A. F.; DEVIENEE, K. F.; RODRIGUES, T.; DORTA, D. J.; RADDI, M. S.; VILEGAS, W.; UYEMURA, S. A.; SANTOS, A. C.; CURTI, C. Effects of isocoumarins isolated from *Paepalanthus bromelioides* on mitochondria: uncoupling, and induction/inhibition of mitochondrial permeability transition. **Chem. Biol. Interact.**, v. 161, n. 2, p. 155-164. 2006.

CAÑEDO, L. M.; PUENTS, J. L. F.; BAZ, J. P. A new isocoumarin antitumor agent produced by a marine bacterium. **Journal of Antibiotics**, v. 50, n. 7, p. 175–176. 1997.

CARNEIRO, M. R. G, DIAS, M. M. D., OLIVEIRA, A. C. A. X., PAUMGARTTEN, J. R. F. Evaluation of mutagenic and antimutagenic activities of α -bisabolol in the *Salmonella*/microsome assay. **Mutation Research**, v. 585, n. 1-2, p. 105–112. 2005.

CERQUEIRA, F. M.; MEDEIROS, M. H. G. de; AUGUSTO, O. Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p.441-449. 2007.

CHOI, S. Y.; HA, T. Y.; AHN, J. Y.; KIM, S. R.; KANG, K. S.; HWANG, I. K.; KIM, S. Estrogenic Activities of Isoflavones and Flavones and their Structure-Activity Relationships. **Planta Med.**, v. 74, n. 1, p. 25–32. 2008.

COELHO, F. F.; NEVES, A. C. O.; CAPELO, C.; FIGUEIRA, J. E. C. Pseudovivipary in two rupestrian endemic species (*Leiothrix spiralis* and *Leiothrix vivipara*). **Current Science**, v. 88, n. 8, p. 1225-1226. 2005.

COELHO, R. G.; VILEGAS, W.; DEVIENNE, K. F.; RADDI, M. S. G. A new cytotoxic naphthopyrone dimer from *Paepalanthus bromelioides*. **Fitoterapia**, v. 71, p. 497–500. Fev. 2000.

COLIN, D.; LANCON, A.; DELMAS, D.; LIZARD, G.; ABROSSINOW, J.; KAHN, E.; JANNIN, B.; LATRUFFE, N. Antiproliferative activities of resveratrol and related compounds in human hepatocyte derived HepG2 cells are associated with biochemical cell disturbance revealed by fluorescence analyses. **Biochimie**, v. 90, p. 1674-1684. June. 2008.

CORDELL, G. A. Changing strategies in natural products chemistry. **Phytochemistry**, v. 40, n. 6, p. 1585–1612. 1995.

COSTA, C. M. R.; HERMANN, G.; MARTINS, C. S.; LINS, L. V.; LAMAS, I. R. **Biodiversidade em Minas Gerais: Um Atlas para a sua conservação**. Belo Horizonte: Fundação Biodiversitas, 1998. 94p.

CZECZOT, H.; TUDEK, B.; KUSZTELAK, J.; SZYMCZYK, T., DOBROWOLSLKA, B.; GLINKOWSKA, G.; MALINOWSKI, J.; STRZELECKA, H. Isolation and studies of the mutagenic activity in the Ames test of flavonoids naturally occurring in medical herbs. **Mutation Research**, v. 240, n. 3, p. 209-216. 1990.

DA SILVA, M. A.; CARDOSO, C. A.; VILEGAS, W.; DOS SANTOS, L. C. High-Performance Liquid Chromatographic Quantification of Flavonoids in Eriocaulaceae Species and Their Antimicrobial Activity. **Molecules**, v. 16, n. 14, p. 4644-4654. 2009.

DA SILVA, M. A. **Estudo químico e biológico de plantas da família Ericaulaceae**. 155f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara. 2008.

DA SILVA, M. A.; OLIVEIRA, A. P. S.; SANNOMIYA, M.; SANO, P. T.; VARANDA, E. A.; VILEGAS, W.; SANTOS, L. C. Flavonoids and a Naphthopyranone from *Eriocaulon ligulatum* and Their Mutagenic Activity. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 55, n.11, p. 1635-1639, 2007.

- DEARFIELD, K. L.; CIMINO, M. C.; MCCARROLL, N. E.; MAUER, I.; VALCOVIC, L. R. Genotoxicity risk assessment: a proposed classification strategy. **Mutation Research**, v. 521, n. 1/2, p. 121–135. 2002.
- DE SÁ FERREIRA, I. C. F.; FERRÃO VARGAS, V. M. Mutagenicity of medicinal plant extracts in Salmonella/microsome assay. **Phytotherapy Research**, v. 13, n. 5, p. 397–400. 1999.
- DEVIENNE, K. F.; CÁLGARO-HELENA, A. F.; DORTA, D. J.; PRADO, I. M.; RADDI, M. S.; VILEGAS, W.; UYEMURA, S. A.; SANTOS, A. C.; CURTI, C. Antioxidant activity of isocoumarins isolated from *Paepalanthus bromelioides* on mitochondria. **Phytochemistry**, v. 68, n. 7, p. 1075-1080. 2007.
- DEVIENNE, K. F.; RADDI, M. S. G.; COELHO, R. G.; VILEGAS, W. Structure–antimicrobial activity of some natural isocoumarins and their analogues. **Phytomedicine**, v. 12, n. 5, p. 378–381. 2005.
- DEVIENNE, K. F.; RADDI, M. S. G.; VARANDA, E. A.; VILEGAS, W. In vitro cytotoxicity of some natural and semi-synthetic isocoumarins from *Paepalanthus bromelioides*. **Zeitschrift fur Naturforschung**, v. 57, n. 1-2, p. 85–88. 2002.
- DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products**. A Biosynthetic Approach. Inglaterra: Ed. Wiley. 1997. 465p.
- DIAS, F. L.; TAKAHASHI, C. S.; SAKAMOTO-HOJO, E. T.; VICHNEWSKI, W.; SARTI, S. J. Genotoxicity of the natural Cercaricides “Sucupira” oil and eremanthine in mammalian cells in vitro and in vivo. **Environmental Molecular Mutagenesis**, v. 26, p. 338–344. 1995.
- DI STASI, L. C.; CAMUESCO, D.; NIETO, A.; VILEGAS, W.; ZARZUELO, A.; GALVEZ, J. Intestinal anti-inflammatory activity of paepalantine, an isocoumarin isolated from the capitula of *Paepalanthus bromelioides* in the trinitrobenzenesulphonic acid model of rat colitis. **Planta Medica**, v. 70, n. 4, p. 315–320. 2004.
- DJIOGUE, S.; HALABALAKI, M.; ALEXI, X.; NJAMEN, D.; FOMUM, Z. T.; ALEXIS, M. N.; SKALTSOUNIS, A. Isoflavonoids from *Erythrina poeppigiana*: Evaluation of Their Binding Affinity for the Estrogen Receptor α . **J. Nat. Prod.**, v. 72, n.9, p. 1603–1607. 2009.
- DOKKEDAL, A. L. **Estudo fitoquímico e implicações taxonômicas de *Paepalanthus Kunth* (Eriocaulaceae)**. 94f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara. 2000.
- DOMINGO, D.; LÓPEZ-BREA, M. Plantas con acción antimicrobiana. **Revista española de Quimioterapia**, v. 16, n. 4, p. 385-393. 2003.
- DUARTE-SILVA, I.; RODRIGUES, A. S.; GASPAR, J.; MAIA, R.; LAIRES, A.; RUEFF, J. Involvement of rat cytochrome 1A1 in the biotransformation of kaempferol to quercetin: Relevance to the genotoxicity of kaempferol. **Mutagenesis**, v. 12, n. 5, p. 383–390. 1997a.

DUARTE-SILVA, I.; RODRIGUES, A. S.; GASPAR, J.; LAIRES, A.; RUEFF, J. Metabolism of galangin by rat cytochromes P450: Relevance to the genotoxicity of galangin. **Mutation Research**, v. 343, n. 3, p. 247–257. 1997b.

DUARTE-SILVA, I.; GASPAR, J.; RODRIGUES, A. S.; GOMES-DA-COSTA, B.; LAIRES, A.; RUEFF, J. Mechanisms of myricetin mutagenicity in V79 cells: Involvement of radicalar species. **Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis**, v. 16, n. 5, p. 253–268. 1996a.

DUARTE-SILVA, I.; RODRIGUES, A.; GASPAR, J.; MAIA, R.; LAIRES, A.; RUEFF, J. Mutagenicity of kaempferol in V79 cells: The role of cytochromes P450. **Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis**, v. 16, n. 4, p. 229–241. 1996b.

EDENHARDER, R.; VON PETERSDORFF, I.; RAUSCHER, R. Antimutagenic effects of flavonoids, chalcones and structurally related compounds on the activity of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ) and other heterocyclic amine mutagens from cooked food. **Mutation Res.**, v. 287, n. 2, p. 261–274. 1993.

EGLETON, R. D.; MITCHELL, S. A.; HUBER, J. D.; JANDERS, J.; STROPOVA, D.; POLT, R.; YAMAMURA, H. I.; HRUBY, V. J.; DAVIS, T. P. Improved bioavailability to the brain of glycosylated Met-enkephalin analogs. **Brain Res**, v. 881, n. 1, p. 37–46. 2000.

FANG, J. J.; YE, G.; CHEN, W. L.; ZHAO, W. M. Antibacterial phenolic components from *Eriocaulon buergerianum*. **Phytochemistry**, v. 69, n.5, p. 1279-1286. 2008.

FERREIRA, M. B., SATURNINO, H. M. Algumas considerações sobre os arranjos ornamentais confeccionados com plantas secas em Minas Gerais. In: FERREIRA, M. B., DEL LACA-BUENDIA, J. P., TENÓRIO, E. C. (eds.) **Anais do XXVIII Congresso Nacional de Botânica**. Belo Horizonte, 1977. p. 201-211.

FIQUEIREDO, I. B. Estudo do fogo em populações de capim dourado (*Syngonanthus nitens* Eriocaulaceae) no Jalapão, TO. 73f. Dissertação (Mestrado em Ecologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília. 2007.

FREEWAY BRASIL. **Serra do Cipó**: galeria de fotos. Disponível em: <<http://www.freeway.tur.br/>> Acesso em: 18 dez. 2007.

GARCIA-REYERO, N.; PIÑA, B.; GRIMALT, J. O.; FERNÁNDEZ, P.; FONTS, R.; POLVILLO, O.; MARTRAT, B. Estrogenic activity in sediments from European mountain lakes. **Environmental and Science Technology**, v. 15, n. 39, p. 1427-1435. 2005.

GASPAR, J.; RODRIGUES, A.; LAIRES, A.; SILVA, F.; COSTA, S.; MONTEIRO, M. J.; MONTEIRO, C.; RUEFF, J. On the mechanisms of genotoxicity and metabolism of quercetin. **Mutagenesis**, v. 9, n. 5, p. 445–449. 1994.

GIULIETTI, A. M.; SCATENA, V. L.; SANO, P. T.; PARRA, L. R.; QUEIROZ, L. P.; HARLEY, R. M.; MENEZES, N. L.; YSEPPON, A. M. B.; SALATINO, A.; VILEGAS, W.; SANTOS, L. C.; RICCI, C. W.; BOMFIM, M. C. P.; MIRANDA, E. B. *Multidisciplinary studies on neotropical Eriocaulaceae*. In: WILSON, K. L.; MORRISON, D. A. (eds.). **Monocots: systematics and evolution**. Melbourne: CSIRO Publishing, 2000. v. 1.

GIULIETTI, A. M.; WANDERLEY, M. G. L.; LONGHI-WAGNER, H. M.; PIRANI, J. R.; PARRA, L. R. Estudos em sempre-vivas: taxonomia com ênfase nas espécies de Minas Gerais, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 10, n. 2, p. 329-377. 1996.

GIULIETTI, A. M.; AMARAL, M. C. E.; BITTRICH, V. Phylogenetic analysis of inter-and infrageneric relationships of *Leiothrix* Ruhland (Eriocaulaceae). **Kew Bulletin**, v. 50, n. 1, p. 55-71. 1995.

GIULIETTI, A. M.; HENSOLD, N. Synonymization of the genera *Comanthera* and *Carptotepala* with *Syngonanthus* (Eriocaulaceae). **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 78, p. 460-464. 1991.

GIULIETTI, A. M., HENSOLD, N. Padrões de distribuição geográfica dos gêneros de Eriocaulaceae. **Acta Bot. Bras.**, v. 4, n. 1, p. 133-158, 1990.

GIULIETTI, N.; GIULIETTI, A. M.; PIRANI, J. R.; MENEZES, N. L. Estudo de sempre-vivas: importância econômica do extrativismo em Minas Gerais, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 1, n. 2, p. 179-193. 1988.

GIULIETTI, A. M.; MENEZES, N. L.; PIRANI, J. R.; MEGURO, M.; WANDERLEY, M. G. L. Flora da Serra do Cipó, Minas Gerais: Caracterização e lista das espécies. **Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo**, v. 9, n. 1, p. 1-151. 1987.

GIULIETTI, A. M. **Os gêneros *Eriocaulon* L. e *Leiothrix* Ruhl. (Eriocaulaceae) na Serra do Cipó, Minas Gerais, Brasil.** 1978. 357 f. Tese (Doutorado em Botânica) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo. 1978.

GHISELLI, G.; JARDIM, W. F. Interferentes endócrinos no ambiente. **Química Nova**, v. 30, n.3, p. 695-706. 2007.

GREEN, S.; CHAMBON, P. Chimeric receptors used to probe the DNA-binding domain of the estrogen and glucocorticoid receptors. **Cancer Research**, v. 15, n. 49, p. 2282-2285, 1989.

HAMBUGUER, M.; HOSTETTMANN, K. Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine. **Phytochemistry**, v. 30, n. 12, p. 3864-3884. 1991.

HARLOW, B. L.; SIGNORELLO, L. B. Factors associated with early menopause. **Maturitas**, v. 35, n. 1, p. 3-9. 2000.

HARVEY, A. Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products. **Drug Discovery Today**, v. 5, n. 7, p. 294-300. 2000.

HAVSTEEN, B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 96, n.2/3, p. 67- 202. 2002.

HAYS, J.; OCKENE, J. K.; BRUNNER, R. L.; KOTCHEN, J. M.; MANSON, J. E.; PATTERSON, R. E. Women's health initiative investigators effects of estrogen plus progestin on health related quality of life. **N. Engl. J. Med.**, v. 348, p. 1835-1837. May 2003.

HERMOSO, A.; JIMENEZ, I. A.; MAMANI, Z. A.; BAZZOCCHI, I. L.; PIÑERO, J. E.; RAVELO, A. G.; VALLADARES, B. Antileishmanial Activities of Dihydrochalcones from *Piper elongatum* and Synthetic Related Compounds. **Structural Requirements for Activity Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 18, p. 3975–3980. 2003.

HERTOG, M. G. L.; FESKENS, E. J. M.; HOLLMAN, P. C. H.; KATAN, M. B.; KROMHOUT, D. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: The Zutphen elderly study. **Lancet**, v. 342, n. 8878, p. 1007–1011. 1993.

HILL, R. A. Naturally occurring isocoumarins. **Fortschritte der Chemie Organischer Naturstoffe**, v. 49, p. 1–78. 1986.

HOULT, J. R. S.; PAYÁ, M. Pharmacological and Biochemical Actions of Simple Coumarins: Natural Products with Therapeutic Potential. **General Pharmacology**, v. 27, n. 4, p. 713-722. 1996.

HUBBARD, R. E.; PIKE, A. C. W.; BRZOZOWSKI, A. M.; WALTON, J.; BONN, T.; GUSTAFSSON, J. -A.; CARLQUIST, M. Structural insights into the mechanisms of agonism and antagonism in oestrogen receptor isoforms. **European Journal of Cancer**, v. 36, s/n, p. S13-S23. 2000.

IBAMA, 2004. **Parque nacional de sempre-vivas**. Disponível em: <<http://www.ambientebrasil.com.br/composer.php3?base=./natural/snuc/index.html&conteudo=./natural/snuc/sudeste/pn/semprevivas.html>>. Acesso em 02 maio 2004.

JARDIM DAS FLORES. **Flores e plantas secas: técnicas de secagem ao ar livre**. Disponível em: <www.jardimdeflores.com.br/DICAS/A16floressecas.htm>. Acesso em: 13 abril 2004.

JIN, J.; LIU, B.; ZHANG, H.; TIAN, X.; CAI, Y.; GAO, P. Mutagenicity of Chinese traditional medicine Semen Armeniacae amarum by two modified Ames tests. **BMC Complement. Altern. Med.**, v. 15, n. 1, p. 43. 2009.

JOLY, A. B. **Conheça a vegetação brasileira**. São Paulo: EDUSP/Polígono, 1970. 181 p.

KAUR, P.; KAUR, S.; KUMAR, N.; SINGH, B.; KUMAR, S. Evaluation of antigenotoxic activity of isoliquiritin apioside from *Glycyrrhiza glabra* L. **Toxicol. In Vitro**, v. 23, n. 4, p. 680-686. 2009.

KINJO, J.; TSUCHIHASHI, R.; MORITO, K.; HIROSE, T.; AOMORI, T.; NAGAO, T.; OKABE, H.; NOHARA, T.; MASAMUNE, Y. Interactions of Phytoestrogens with Estrogen Receptors α and β (III). Estrogenic Activities of Soy Isoflavone Aglycones and Their Metabolites Isolated from Human Urine. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 27, n. 2, p. 185-188. 2004.

KITAGAWA, R. R.; RADDI, M. S.; SANTOS, L. C.; VILEGAS, W. A new cytotoxic naphthoquinone from *Paepalanthus latipes*. **Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)**, v. 52, n. 12, p. 1487-1488. 2004.

- KOSTOVA, I. Synthetic and natural coumarins as cytotoxic agents. **Current Medicinal Chemistry**, v. 5, n. 1, p. 29–46. 2005.
- KURZER, M. S.; XU, X. Dietary phytoestrogens. **Annual Review of Nutrition**, v. 17, p. 353-381. July 1997.
- LEHMANN, L.; ESCH, H. L.; WAGNER, J.; ROHNSTOCK, L.; METZLER, M. Estrogenic and genotoxic potential of equol and two hydroxylated metabolites of Daidzein in cultured human Ishikawa cells. **Toxicology Letters**, v. 158, n. 1, p. 72-86. 2005.
- LEITE, A. C. L.; VIEIRA, R. F. F.; MOREIRA, D. R. M.; BRONDANI, D. J.; SRIVASTAVA, R. M.; SILVA, V. F.; MORAIS JR., M. A. Genotoxic activity of 3-[3-phenyl-1,2,4-oxadiazol-5-yl] propionic acid and its peptidyl derivatives determined by Ames and SOS response tests. **Mutation Research**, v. 588, n. 2, p. 166–171. 2005.
- LIN, M. C.; CHENG, H. W.; TSAI, Y. C.; LIAO, P. L.; KANG, J. J.; CHENG, Y. W. Podophyllin, but not the constituents quercetin or kaempferol, induced genotoxicity in vitro and in vivo through ROS production. **Drug. Chem. Toxicol.**, v. 32, n. 1, p. 68-76. 2009.
- MACGREGOR, J. T.; JURD, L. Mutagenicity of plant flavonoids: Structural requirements for mutagenic activity in *Salmonella typhimurium*. **Mutation Research**, v. 54, n. 3, p. 297–309. 1978.
- MARON, D. M.; AMES, B. N. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. **Mutation Research**, v. 113, n. 3-4, p. 173-215. 1983.
- MATSUMURA, A.; GHOSH, A., POPE, G. S., DARBRE, P. D. Comparative study of oestrogenic properties of eight phytoestrogens in MCF7 human breast cancer cells. **J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.**, v. 94, n. 5, p. 431-43. 2005.
- MEISLER, J. G. Toward optimal health: the experts discuss the use of botanicals by women. **Journal of Women's Health**, v. 12, n. 9, p. 847–852. 2003.
- MENEZES, N. L.; GIULIETTI, A. M. Campos rupestres: paraíso botânico na serra. **Ciência Hoje**, v. 5, n. 25, p. 38-44. 1986.
- MICSICEK, R. J. Interaction of naturally occurring nonsteroidal estrogens with expressed recombinant human estrogen receptor. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular**, v. 49, n. 2/3, p. 153-160. 1994.
- MICSICEK, R. J. Commonly occurring plant flavonoids have estrogenic activity. **Molecular Pharmacology**, v. 44, n. 6, p. 37-43. 1993.
- MOLDENKE, N.H. **A fifth summary of the Verbenaceae, Avicenniaceae, Stilbeaceae Discrasyliidaceae, Symphoremaceae, Nyctanthaceae and Eriocaulaceae of the world as to valid taxa, geographic distribution and synonymy.** Ann Arbor: Braun-Brunfield, INC. 1971.

- MORITO, K.; AOMORI, T.; HIROSE, T.; KINJO, J.; HASEGAWA, J.; OGAWA, S.; INOUE, S.; MURAMATSU, M.; MASAMUNE, Y. Interaction of phytoestrogens with estrogen receptors α and β (II). **Biol. Pharm. Bull.**, v. 25, n. 2, p. 48-52. 2002.
- MULLER, L.; KASPER, P.; MADLE, S. The quality of genotoxicity testing of drugs. Experiences of a regulatory agency with new and old compounds. **Mutagenesis**, v. 6, n. 2, p. 143-149. 1991.
- MURRAY, R. D. H. Coumarins. **Natural Products Reports**, p. 591-618. 1989.
- NAGAO, M.; MORITA, N.; YAHAGI, T.; SHIMIZU, M.; KUROYANAGI, M.; FUKUOKA, M.; YOSHIHARA, K.; NATORI, S.; FUJINO, T.; SUGIMURA, T. Mutagenicities of 61 flavonoids and 11 related compounds. **Environ. Mutagen.**, v. 3, n. 4, p. 401-419, 1981.
- NAJAFZADEH, M.; REYNOLDS, P. D.; BAUMGARTNER, A.; ANDERSON, D. Flavonoids inhibit the genotoxicity of hydrogen peroxide (H₂O₂) and of the food mutagen 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]-quinoline (IQ) in lymphocytes from patients with inflammatory bowel disease (IBD). **Mutagenesis**, v. 24, n. 5, p. 405-411. 2009.
- NEGRI, L.; LATTANZI, R.; TABACCO, F.; ORRU, L.; SEVERINI, C.; SCOLARO, B.; ROCCHI, R. Dermorphin, and deltorphin glycosylated analogues: synthesis, and antinociceptive activity after systemic administration. **J. Med. Chem.**, v. 42, n. 3, p. 400-4. 1999.
- OGURA, R.; IKEDA, N.; YUKI, K.; MORITA, O.; SAIGO, K.; BLACKSTOCK, C.; NISHIYAMA, N.; KASAMATSU, T. Genotoxicity studies on green tea catechin. **Food Chem. Toxicol.**, v. 46, n. 6, p. 190-200. 2008.
- OJALA, T. **Biological Screening of Plant Coumarins**. 2001. 62 f. Academic Dissertation - University of Helsinki, 2001.
- OKAMOTO, T.; KOBAYASHI, T.; YOSHIDA, S. Chemical aspects of coumarin compounds for the prevention of hepatocellular carcinomas. **Current Medicinal Chemistry**, v. 5, n. 1, p. 47-51. 2005.
- OLDENDORF, W. H.; HYMAN, S.; BRAUN, L.; OLDENDORF, S. Z. Blood-brain barrier: penetration of morphine, codeine, heroin, and methadone after carotid injection. **Science**, v. 178, n. 4064, p. 984-986. 1972.
- PLISKOVA, M.; VONDRACEK, J.; KREN, V.; GAZAK, R.; SEDMERA, P.; Daniela WALTEROVA, D.; PSOTOVA, J.; SIMANEK, V.; MACHALA, M. Effects of silymarin flavonolignans and synthetic silybin derivatives on estrogen and aryl hydrocarbon receptor activation. **Toxicology**, v. 215, n. 1-2, p. 80-89. 2005.
- POLT, R.; PORRECA, F.; SZABO, L. Z.; BILSKY, E. J.; DAVIS, P.; ABBRUSCATO, T. J.; DAVIS, T. P.; HARVATH, R.; YAMAMURA, H. I.; HRUBY, V. J. Glycopeptide enkephalin analogues produce analgesia in mice: evidence for penetration of the blood-brain barrier. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 91, n. 15, p. 7114-7118. 1994.

- PIKE, A. C. W. Lessons learnt from structural studies of the oestrogen receptor. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 20, n. 1, p. 1–14. 2006.
- PINTO, A. C. Produtos Naturais: Atualidade, Ensaio e Perspectivas. **Química Nova**, v. 25, supl. 1, p. 45-61. 2002.
- PUGALENDHI, P.; MANOHARAN, S.; PANJAMURTHY, K.; BALAKRISHNAN, S.; NIRMAL, M. R. Antigenotoxic effect of genistein against 7,12-dimethylbenz[a]anthracene induced genotoxicity in bone marrow cells of female Wistar rats. **Pharmacol. Rep.**, v. 61, n. 2, p. 296-303. 2009.
- RICCI, C. V.; PATRICIO, M. C.; SALATINO, M. L.; SALATINO, A.; GIULIETTI, A. M. Flavonoids of *Syngonanthus* Ruhl. (Eriocaulaceae): taxonomic implications. **Biochem. Syst. Ecol.**, v. 24, n. 6, p. 577-583. 1996.
- RIMM, E. B.; KATAN, M. B.; ASCHERIO, A.; STAMPFER, M. J.; WILLETT, W. C. Relation between intake of flavonoids and risk for coronary heart disease in male health professionals. **Annals of Internal Medicine**, v. 125, n. 5, p. 384–389. 1996.
- SANDNES, D.; JOHANSEN, T.; TEIEN, G.; ULSAKER, G. Mutagenicity of crude senna and senna glycosides in *Salmonella typhimurium*. **Pharmacol. Toxicol.**, v. 71, n. 3, p. 165-72, 1992.
- SANO, P. T. **Revisão de *Actinocephalus* (Koern.) Sano – Eriocaulaceae**. 241 f. Tese (Doutorado em Botânica) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999.
- SANTOS, L. C.; RODRIGUES, C. M.; SILVA, M. A.; COELHO, R. G., SANNOMIYA, M.; VILEGAS, W. Chemical profile of *Eriocaulon ligulatum* (Vell.) L. B. Smith (Eriocaulaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 33, n. 11, p. 1159-1166, nov. 2005.
- SANTOS, L. C.; PIACENTE, S.; PIZZA, C.; ALBERT, K.; DACHTLER, M.; VILEGAS, W. Planifolin, a new naphthopyranone dimer and flavonoids from *Paepalanthus planifolius*. **Journal of Natural Products**, v. 64, n. 1, p. 122–124. 2001a.
- SANTOS, L. C.; PIACENTE, S.; DE RICCARDIS, F.; ELETTO, A. M.; PIZZA, C.; VILEGAS, W. Xanthonés and flavonoids from *Leiothrix curvifolia* and *Leiothrix flavescens*. **Phytochemistry**, v. 56, n. 8, p. 853-856. 2001b.
- SANTOS, L. C.; ANDRADE, F. P.; VASCONCELOS, E. C.; COELHO, R. G.; DOKKEDAL, A. L.; GARCIA, A. L.; SANO, P. T.; VILEGAS, W. Separation of flavonoids and naphthopyrones from four Brazilian *Paepalanthus* species by droplet countercurrent chromatography. **Brazilian Journal Medical Plants**, v. 2, p. 43–47. 1999.
- SETCHELL, K. D. Soy isoflavones--benefits and risks from nature's selective estrogen receptor modulators (SERMs). **J. Am. Coll. Nutr.**, v. 20, n. 90.0005p. 354S-362S. 2001.
- SHU, Y. Z. Recent Natural Products Based Drug Development: A Pharmaceutical Industry Perspective. **Journal of Natural Products**, v. 61, n. 8, p. 1053-1071. 1998.

- SILVA, I. D.; RODRIGUES, A. S.; GASPAR, J.; MAIA, R.; LAIRES, A.; RUE, J. Involvement of rat cytochrome A1 in the biotransformation of kaempferol to quercetin: relevance to the genotoxicity of kaempferol. **Mutagenesis**, v. 12, n. 5, p. 383–390. 1997.
- SIMÕES, C. M. O.; SCKENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: Universidade/UFRGS/UFSC. 1999.
- SOHNI, Y. R.; MUTANGADURA-MHLANGA, T.; KALE, P. G. Bacterial mutagenicity of eight medicinal herbs from Zimbabwe. **Mutation Research**, v. 322, n. 2, p. 133-140. 1994.
- SUMITANI, J. S. de A. **Estudo químico de Eriocaulaceae**. 2007. 70 f. Dissertação(Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara. 2007.
- SWAN, S. H.; ELKIN, E. P.; FENSTER, L. Revisão sobre a questão do declínio da densidade dos espermatozoides: uma análise dos 101 estudos publicados entre 1934-1996. **Environmental Health Perspectives**, v. 108, n. 10. 2000.
- TAIRA, K.; MIYASHITA, Y.; OKAMOTO, K.; ARIMOTO, S.; TAKAHASHI, E.; NEGISHI, T. Novel antimutagenic factors derived from the edible mushroom *Agrocybe cylindracea*. **Mutation Research**, v. 586, n. 2, p. 115–123. 2005.
- TAKUMI-KOBAYASHI, A.; OGURA, R.; MORITA, O.; NISHIYAMA, N.; KASAMATSU, T. Involvement of hydrogen peroxide in chromosomal aberrations induced by green tea catechins in vitro and implications for risk assessment. **Mutation Research**, v. 657, n. 1, p. 13-18. 2008.
- TAMURA, G.; GOLD, C.; FERR-LUZI, A.; AMES, B. N. Fecalase: A model for activation of dietary glycosides to mutagens by intestinal flora. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 77, n. 8, p. 4961. 1981.
- TAO, Y. **Compositions and methods for treating eye discomfort**. USA patent request number 872403. 2003.
- THOMPSON, A. M.; REWCASTLE, G. W.; BOUSHELLE, S. L.; HARTL, B. G.; KRAKER, A. J.; LU, G. H.; BATLEY, B. L.; PANEK, R. L.; SHOWALTER, H. D. H.; DENNY, W. A. Synthesis and Structure-Activity Relationships of 7-Substituted 3-(2,6-Dichlorophenyl)-1,6-naphthyridin-2(1H)-ones as Selective Inhibitors of pp60c-src. **J. Med. Chem.**, v. 43, n. 16, p. 3134-3147. 2000.
- TOMATIS, R.; MARASTONI, M.; BALBONI, G.; GUERRINI, R.; CAPASSO, A.; SORRENTINO, L.; SANTAGADA, V.; CALIENDO, G.; LARAZUS, L. H.; SALVADORI, S. Synthesis, and pharmacological activity of deltorphin, and dermorphin-related glycopeptides. **J. Med. Chem.**, v. 40, n. 18, p. 2948–52. 1997.
- UTESCH, D.; FEIGE, K.; DASENBROCK, J.; BROSCARD, T. H.; HARWOOD, M.; DANIELEWSKA-NIKIEL, B.; LINES, T. C. Evaluation of the potential in vivo genotoxicity of quercetin. **Mutation Research**, v. 654, n. 1, p. 38-44. 2008.

VAN WYK, B. E.; VAN OUTSHOORN, B.; GERIKE, N. **Medicinal Plants of South Africa**. Pretoria: Briza Publications. 1997.

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

VARANDA, E. A.; DEVIENNE, K. F.; RADDI, M. S. G.; FURUYA, E. M.; VILEGAS, W. Mutagenicity of paepalantine dimer and glycoside derivatives from *Paepalanthus bromelioides*. **Toxicology in Vitro**, v. 18, n. 1, p. 109–114. 2004.

VARANDA, E. A.; RADDI, M. S. G.; DIAS, F. L. P.; ARAUJO, M. C. S.; GIBRAN, S. C. A.; TAKAHASHI, C. S.; VILEGAS, W. Evaluation of the genotoxic potential of the isocoumarin paepalantine in vivo and in vitro mammalian systems. **Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis**, v. 17, n. 2, p. 85-95. 1997.

VERPOORTE, R. Exploration of nature's chemodiversity: the role of secondary metabolites as leads in drugs development. **Drug Discovery Today**, v. 3, n. 5, p. 232-238. 1998.

VERSCHAEVE, L.; KESTENS, V.; YAYLOR, J. L. S.; ELGORASHI, E. E.; MAES, A.; VAN PUYVELDE, L.; DE KIMPE, N.; VAN STADEN, J. Investigation of the antimutagenic effects of selected South African medicinal plant extracts. **Toxicology in Vitro**, v. 18, n. 1, p. 29-35. 2004.

VIEIRA, M. L. T.; DUARTE, R. F.; CAMPOS, L. M. M.; NUNAN, E. A. Comparison of the estrogenic potencies of standardized soy extracts by immature rat uterotrophic bioassay. **Phytomedicine**, v. 15, n. 1, p. 31–37. 2008.

VILEGAS, W.; ROQUE, N. F.; SALATINO, A.; GIESBRECHT, A. M.; DAVINO, S. Isocoumarin from *Paepalanthus bromelioides*. **Phytochemistry**, v. 29, n. 7, p. 2299–2301. 1990.

VILEGAS, W. **RMN aplicada à Química de Produtos Naturais**. 97 f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo. 1989.

XIE, E. **Health liquid of snake bile**. European patent request number CN1115655. 1996.

XIN, D. Phytoestrogens from *Psoralea corylifolia* reveal estrogen receptor-subtype selectivity. **Phytomedicine**, v.17, n. 2, p.126-131. 2009.

ZAND, R. S. R.; JENKINS, D. J. A.; DIAMANDIS, E. P. Flavonoids and steroid hormone-dependent cancers. **Journal of Chromatography**, v. 777, n. 1-2, p. 219–232. 2002.

ZHANATAEV, A. K.; KULAKOVA, A. V.; NASONOVA, V. V.; DURNEV, A. D. In vivo study of dihydroquercetin genotoxicity. **Bull. Exp. Biol. Med.**, v. 145, n. 3, p. 338-340. 2008.

WEISBURGER, J. H.; HARA, Y.; SOLAN, L.; LUO, F. Q.; PITTMAN, B.; ZANG, E. Tea polyphenols as inhibitors of mutagenicity of major classes of carcinogens. **Mutation Research**, v. 371, n. 1-2, p. 57–63. 1996.

YAGER, J. D.; DAVIDSON, N. E. Estrogen carcinogenesis in breast cancer. **N. Engl. J. Med.**, v. 354, n. 3, p. 270–282. 2006.

YUAN, Y.; CHEN, C.; YANG, B.; KUSU, F.; KOTANI, A. DPPH radical scavenging activities of 31 flavonoids and phenolic acids and 10 extracts of Chinese materia medica. **Zhongguo Zhong Yao Za Zhi**, v. 34, n. 13, p. 1695-700. 2009.

**Mutagenicity and structure-activity relationship of compounds isolated from
Eriocaulon ligulatum (Eriocaulaceae) measured by *Salmonella*/microsome assay**

† Ana Paula Siqueira de OLIVEIRA, ‡ Marcelo Aparecido da SILVA, § Paulo Takeo SANO, ‡
Wagner VILEGAS, ‡ Lourdes Campaner dos SANTOS, † Eliana Aparecida VARANDA*

† *Department of Biological Sciences, Faculty of Pharmaceutical Sciences of Araraquara,
Estadual Paulista University,*

UNESP-Rodovia Araraquara-Jaú Km 1, 14801-902 Araraquara, SP, Brazil

‡ *Chemical Institute of Araraquara, Estadual Paulista University, UNESP, Rua Professor
Francisco Degni, s/n,*

CP355, 14801-970 Araraquara, SP, Brazil

§ *Department of Botany, Instituto de Biociências, São Paulo University; C.P. 11461, São
Paulo 054220-970, Brazil.*

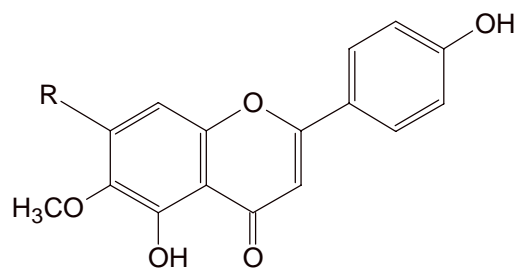
RUNNING TITLE: Mutagenic Activity of Eriocaulaceae in Ames Test.

* Corresponding author: *Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Ciências
Farmacêuticas de Araraquara, Universidade Estadual Paulista, UNESP, Rodovia
Araraquara-Jaú Km 1, 14801-902, Araraquara, SP, Brazil*

Tel.: +55-16-3301-6951; Fax: +55-16-3301-6940

E-mail address: varandae@fcfar.unesp.br

TOC

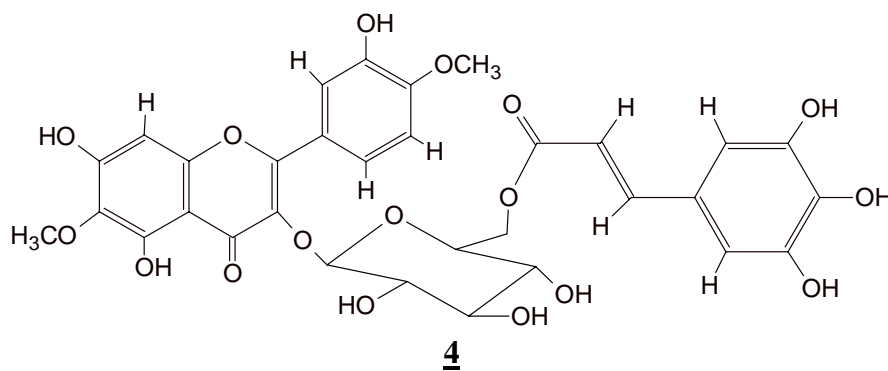


Compounds

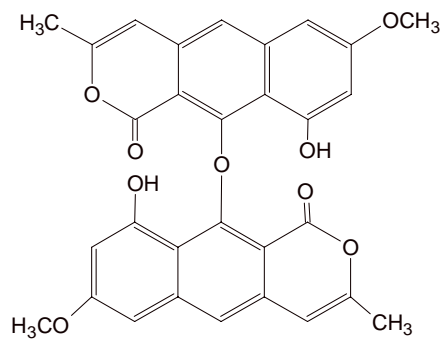
1
2
3

R

OH
O-Glc
O-Allo

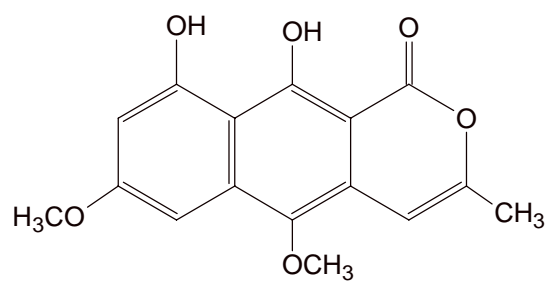


4

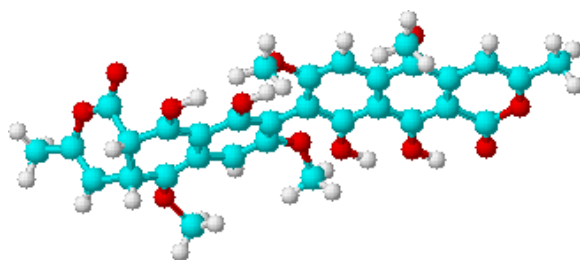


5

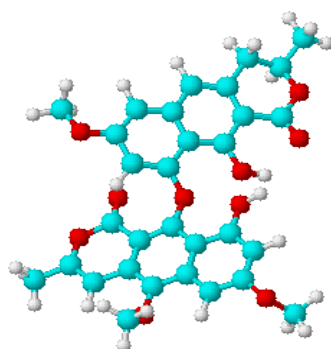
Figure 1. Compounds isolated from *E. ligulatum*



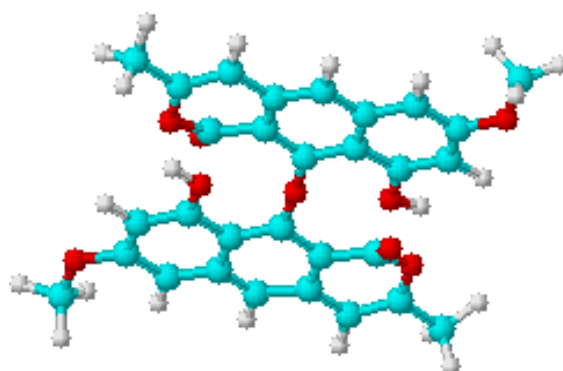
Paepalantine



8-8' dimer of Paepalantine



Planifolin



Eriocauline

Figure 2. Naphthopyranones isolated from plants of the Eriocaulaceae family.

Abstract

Plants produce a large number of compounds used by the pharmaceutical industry as medicines. Some of them have cytotoxic, genotoxic and mutagenic effects. *Eriocaulon ligulatum*, a species of the family Eriocaulaceae, a Brazilian flower whose name is “botão dourado”. The objective of this study was to assay the enriched fractions and isolated substances extracted from *E. ligulatum* capitula in the Ames test and to establish the structure-mutagenic activity relationship of some isolated compounds. The *Salmonella* mutagenicity assay was performed with *S. typhimurium* strains TA100, TA98, TA97a and TA102, with and without S9. The glycosylated flavonoids + naphthopyranones and the aglycone flavonoid + naphthopyranone fractions and all five isolated substances (6-methoxyapigenin (**1**), 6-methoxyapigenin-7-*O*- β -D-glucopyranoside (**2**), 6-methoxyapigenin-7-*O*- β -D-allopyranoside (**3**), 6,4'-dimethoxyquercetin-3-*O*- β -D-6''[3,4,5-trihydroxy (*E*)-cinnamoyl]glucopyranoside (**4**) and eriocauline (**5**)) were shown to be mutagenic, especially after metabolization. These results allowed us to elicit a structure-mutagenic activity relationship for the isolated compounds of *E. ligulatum* and to compare them with some naphthopyranones that were isolated from other species of Eriocaulaceae. This analysis suggested that glycosylation reduces the mutagenic activity; thus, when S9 metabolization was performed on the glycosylated flavonoids, the mutagenicity was restored, implying that the sugar was removed and the aglycone form released. The dimers of naphthopyranones had variable mutagenic activity, which depended on their conformation and the positions of their hydroxyl groups. The mutagenic effect was increased when the hydroxyl groups were more available to interact with the nitrogen bases of the DNA. These conclusions add to the current information on this species in particular, on what is required for the molecules to exert mutagenic action, in order to assess the risk of consuming this plant and to have possible target-specific agents against cancer cell lines.

Key words: *Eriocaulon ligulatum*; mutagenicity, Eriocaulaceae, naphthopyranones, flavonoids, Ames test.

Introduction

Plants are important sources of biologically active natural products, which differ widely in terms of structure. They are the original source of a variety of compounds used by the pharmaceutical industry as medicines. Much research has been and is being done on plants in popular use, with the objective of identifying natural products with therapeutic potential (1-3).

The *Eriocaulon* genus comprises around 435 species, which are distributed through the Americas, Africa, Asia and Europe (4). In Brazil, there are 59 species geographically distributed the length of the country, from Amazonas to Rio Grande do Sul. However, they are concentrated mainly in the middle, in São Paulo State, Goiás State and especially in Minas Gerais State, where 31 species have been found (5). Scientific research on *Eriocaulon* is scarce and very little is known about its chemical constituents. Santos et al and Silva et al (6, 7) reported the isolation and characterization of taxonomically relevant naphthopyranones and flavonoids from the capitula and scapes of *Eriocaulon ligulatum*.

E. ligulatum (Vell.) L.B. Smith. is known in Brazil as “botão dourado” (golden button) and it is exported to Europe, Japan and North America as an ornamental flower, constituting an important source of income to the local population in Minas Gerais State (6).

Previous studies with isolated substances of *Paepalanthus bromelioides*, *P. vellozioides* and *P. planifolius*, other species of Eriocaulaceae, showed positive results in the Ames test (8-10). The mutagenicity of methanol and dichloromethane extracts of *E. ligulatum* has also been assessed in previous work and it was observed that the methanol extract exhibited mutagenic activity in the *Salmonella*/microsome assay, in strains TA100, TA97a and TA102, while the dichloromethane extract was mutagenic in strain TA98 (7).

The *Salmonella typhimurium*/microsome assay (Ames test) is a widely accepted rapid bacterial assay to identify substances that may produce genetic damage that leads to gene

mutations. The Ames test is used world-wide as an initial screen to determine the mutagenic potential of new chemicals and drugs (11). The test is also used to assess the mutagenicity of many existing compounds, including those obtained from commonly used medicinal plant extracts, those arising from the metabolism of synthetic and herbal drugs and food derivatives (12-15).

The establishment of the structure-activity relationship of certain flavonoids and naphthopyranones, in the *S. typhimurium* reversion assay, has made a great contribution to the improved understanding of the possible effects and mechanisms of action of those compounds and is very useful in making comparisons between similar compounds obtained from different species of plant (8-10, 16-20)

The aim of this report was to determine the mutagenic effect of enriched fractions and substances isolated from *E. ligulatum* (Vell.) L.B. Smith in the *Salmonella*/microsome assay, and to establish the structure-activity relationship of some isolated compounds and similar compounds such as paepalantine, the 8-8' dimer of paepalantine and planifolin, obtained respectively from other species of Eriocaulaceae, *P. vellozioides*, *P. bromelioides* and *P. planifolius*.

Materials and methods

Plant material. Capitula of *E. ligulatum* (Vell.) L. B. Smith were collected in May of 1999, at Diamantina, Minas Gerais State, Brazil and authenticated by Dr. Paulo Takeo Sano of the Institute of Biosciences of São Paulo University, São Paulo, Brazil (IB-USP). A *voucher* specimen (SANO n° 2978) was deposited at the Herbarium of IB-USP.

Extraction and isolation.

Fractions. Enriched fractions were prepared from a portion (3.0 g) of the methanolic extract (MeOH) of *E. ligulatum*, by subjecting it to column chromatography on Sephadex LH-20 (100 x 5 cm) with MeOH as the eluent. One hundred fractions (5 mL) were automatically collected on a Redifrac collector and checked by thin layer chromatography (TLC) on Silica gel plates, with CHCl₃:MeOH:*n*-PrOH:H₂O (5:6:1:4, v/v/v/v, lower phase) as mobile phase. Plates were observed with UV light (254 nm) and also developed with anisaldehyde/sulfuric acid or natural products/polyethyleneglycol (NP/PEG) reagents (21). The collected fractions were: **GF** – Glycosylated flavonoids, **GAFN** – Glycosylated flavonoids + Aglycone flavonoids + Naphthopyranones and **AFN** – Aglycone flavonoids + naphthopyranones.

Isolated compounds. Capitula of *E. ligulatum* (300 g) were separated, powdered and successively macerated at room temperature with hexane (2:1), methylene chloride (2:1) and methanol (2:1), being left for one week in each solvent. The solvents were evaporated under reduced pressure to yield gummy extracts. The yields of the hexane, dichloromethane and methanolic extracts from the dried and powdered of *E. ligulatum* capitula were 0.93%, 1.45% and 3.55%, respectively. The methanolic extract (4.0 g) was partitioned three times with a mixture of ethyl acetate:water (1:1, v/v). The ethyl acetate was evaporated at 35 °C under reduced pressure, affording an ethyl acetate fraction of 1.25 g, while 2.75 g was obtained from the aqueous phase. The aqueous fraction (2.7 g) was partitioned with a mixture of *n*-butanol:water (1:1, v/v, repeated 3 times), affording 1.1 g of extract in the resultant *n*-butanol phase and 1.3 g in the resultant aqueous phase. The *n*-butanol fraction (450 mg) was subjected to HSCCC (P.C.Inc.) in four gradients (reverse phase), composed of (A) ethyl acetate:*n*-butanol:water (140:2:80, v/v/v), (B) ethyl acetate:*n*-butanol:water (140:4:80, v/v/v), (C) ethyl acetate:*n*-butanol:water (140:6:80, v/v/v) and (D) ethyl acetate:*n*-butanol:water (140:8:80,

v/v/v), using (H→T), triple coil, 1.6 130mm (large coil), flow rate 1.0 mL min⁻¹. The lower aqueous phase was used as the stationary phase. The retention of the stationary phase for this solvent system was 87.7% at 850 rpm. Portions of 5 mL were collected, monitored by TLC [silica gel plates eluted with CHCl₃:MeOH:*n*-PrOH:H₂O (5:6:1:4, v/v/v/v lower phase)] and developed with anisaldehyde/H₂SO₄ solution and NP/PEG reagent. From the HSCCC experiment, four flavonoids were isolated (**1–4 – Fig.1**) in order of increasing polarity of the mobile phase. Fractions 15–19 (9 mg) afforded 6-methoxyapigenin (**1**). Fractions 40–49 (7 mg) afforded 6-methoxyapigenin-7-*O*-β-D-glucopyranoside (**2**). Fractions 54–60 (20 mg) afforded 6-methoxyapigenin-7-*O*-β-D-allopyranoside (**3**). Fractions 67–73 (14 mg) afforded 6,4'-dimethoxyquercetin-3-*O*-β-D-6''[3,4,5-trihydroxy (*E*)-cinnamoyl]glucopyranoside (**4**). The dichloromethane plant extract (2.0 g) were fractioned using column chromatography on silica gel, eluted with several gradient mixtures of hexane–ethyl acetate. Fractions 51–55 (20mg total) afforded eriocauline (**5 – Fig.1**), which was identified by 1-D and 2-D NMR spectra IV, UV and HR-ESI-MS (7).

***Salmonella* mutagenicity assay.**

Chemicals. Dimethylsulfoxide (DMSO), nicotinamide adenine dinucleotide phosphate sodium salt (NADP), D-glucose-6-phosphate disodium salt, L-histidine monohydrate, and D-biotin were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, U.S.A.). The S9 fraction from Aroclor 1254-treated rats was obtained from Molecular Toxicology, Inc. (Annapolis, MD, USA).

Standard Mutagens. Sodium azide, 2-anthramine, mitomycin and 4-nitro-*O*-phenylenediamine were also obtained from Sigma. Oxoid Nutrient Broth N° 2 (Oxoid, England) and Difco Bacto Agar (Difco, U.S.A.) were used for the preparation of bacterial

growth media. All other reagents used to prepare buffers and media were from Merck (Whitehouse Station, NJ, U.S.A.) and Sigma.

Experimental Procedure. The *Salmonella* mutagenicity assay was performed with *S. typhimurium* strains TA100, TA98, TA97a and TA102, preincubated for 20–30 min with the test substance, with and without metabolic activation (22). The S9-mix was freshly prepared before each test using an Aroclor-1254-induced rat liver fraction. *S. typhimurium* strains were kindly provided by Dr. B. Ames, University of California (Berkeley, CA, U.S.A.). The concentrations of the fractions and isolated substances were chosen and the experimental procedure was performed in accordance with our previous studies (7-9, 23). Five different concentrations of the fractions and isolated compounds were tested in this assay. All of them were diluted in dimethylsulfoxide. The **GF** fraction was tested in doses of 0.4, 0.8, 1.5, 3.0 and 4.6 mg/plate, **GAFN** in the doses of 0.6, 1.1, 2.2, 4.5 and 6.7 mg/plate, **AFN** at 0.1, 0.2, 0.4, 0.8 and 1.2 mg/plate. The results obtained with the extracts (7) and enriched fractions of *E. ligulatum* were more accentuated in the TA102 and TA97a strains, so we chose these strains to assess the mutagenicity of the isolated compounds (Fig. 1), which were tested at the concentrations: **(1)**→ 10.8, 21.6, 43.3, 86.5 and 129.8 µg/plate; **(2)**→ 29.6, 59.3, 118.5, 237.0 and 355.5 µg/plate; **(3)** →27.0, 54.0, 108.0, 216.0 and 324.0 µg/plate; **(4)** → 8.2, 16.4, 32.7, 65.5 and 98.3 µg/plate; **(5)** →1.25, 2.5, 5.0, 7.5 and 15.0 µg/plate. Paepalantine, a naphthopyranone isolated from *P. vellozioides*, was also tested in the strain TA97a at concentrations that varied from 0.06 to 1.0 µg/plate. In previous studies conducted by our group (8), paepalantine had been tested with TA100, TA98 and TA102 strains of *S. typhimurium*, at concentrations that varied from 2.0 -128.0 µg/plate. The standard mutagens used as positive controls in experiments without S9-mix were 4-nitro-*O*-phenylenediamine (10 µg/plate) for TA98 and TA97a, sodium azide (1.25 µg/plate) for TA100 and mitomycin

(0.5 µg/plate) for TA102. In tests with metabolic activation, 2-anthramine (0.125 µg/plate) was used for all strains. DMSO (100 µL/plate) served as the negative (solvent) control. The statistical analysis was performed with the Salanal computer program, adopting the Bernstein model (24). The slope of the linear portion of the dose–response curve, calculated by linear regression as the number of revertants/µg of the sample, was named the mutagenic potency (MP). The mutagenic index (MI), defined as the average number of revertants per plate divided by the average number of revertants per plate in the negative control (solvent), was calculated for each dose. A sample was considered positive when the mutagenic index was equal to or greater than 2 for at least one of the tested doses and also if it had a reproducible dose-response curve.

Results

Table 1 shows the mutagenic activity of enriched fractions **GF** and **GAFN** obtained from the methanol extract of *E. ligulatum*. Positive results were observed with fraction **GAFN** in the strains TA102 (+S9) and TA97a (–S9 and +S9), while for fraction **GF** the results were negative in all tested strains. For the fraction **AFN** (Table 2), mutagenic activity was only observed in the TA102 strain in the presence of S9.

The five isolated substances (Fig. 1) were all considered mutagenic in the Ames test in the two tested strains (TA102 and TA97a), but for the tested flavonoids (**1**, **2**, **3** and **4**), the mutagenicity was stronger in the presence of S9 mixture. Table 3 shows the results for compounds **1** and **2** and Table 4 for **3** and **4**. For compound **5**, a naphthopyranone named “eriocauline”, the mutagenic activity was very strong, with and without metabolization (Table 5).

Table 6 shows the results obtained with paepalantine in the strain TA97a. The mutagenic activity was positive both in the presence and absence of S9 fraction.

Table 7 shows the mutagenic potency of substances (paepalantine, 8-8' dimer of paepalantine, planifolin and eriocauline) isolated from Eucariolaceae family plants, with (+S9) or without (-S9) metabolic activation. The 8-8' dimer of paepalantine was the only negative substance in all tested strains. Paepalantine gave the most prominent results of all the tested substances, in the TA97a strain. Planifolin and eriocauline also gave positive results, most prominently again in TA97a, without metabolization.

Discussion

The phytochemical analyses of the methanol extract of *E. ligulatum*, which gave the most significant results, showed the presence of flavonoids and naphthopyranones, as well as their derivatives. In the dichloromethane extract, a naphthopyranone named “eriocauline” was found (Fig.1) (7).

The tests for mutagenic activity in the enriched fractions, obtained from the methanol extract of *E. ligulatum*, showed positive results for the fractions **GAFN** and **AFN**, in the presence of metabolization (+S9) in the TA102 strain; and for the fraction **GAFN**, both in the presence and in the absence of S9 mixture, in the TA97a strain. We can conclude that the substances probably responsible for the mutagenicity were the naphthopyranones and flavonoid aglycones.

In the methanol extract, there was a prevalence of flavonoids (7). Flavonoids are known for their beneficial activities with respect to the human health (25, 26), but several studies have demonstrated that these compounds possess genotoxic activity (23, 27, 28).

A structure-activity relationship of certain flavonoids, which exhibit positive mutagenicity in the *S. typhimurium* reversion assay, was identified in some earlier studies (16-20).

According to Czczot et al (18), a hydroxyl group presents on position 7 favors the appearance of mutagenic activity. Out of all the isolated flavonoids evaluated, (2) and (3) present sugar on position 7 of the A ring and they are not mutagenic in the absence of metabolization (-S9). When metabolization was used, mutagenic activity was shown for both substances, probably because the sugar was removed and a hydroxyl was restored to that position. The flavonoid (1), which is in the aglycone form and therefore has no sugar in its structure, was the only flavonoid that presented mutagenicity without metabolization.

According to Nagao et al (17), to exert a strong mutagenic activity, flavonoids must possess a double bond between carbons 2 and 3 on the C ring, and a hydroxyl group at position 3 on the same ring. All the studied flavonoids found in the methanol extract of *E. ligulatum* have a double bond between carbons 2 and 3 on the C ring, explaining their observed mutagenicity. The flavonoid (4) possesses a sugar at position 3 on C the ring and its mutagenicity was considered negative in the absence of metabolization. With S9 metabolization, probably this sugar was also removed and the hydroxyl group restored, favoring the appearance of the mutagenicity (17, 19).

The dichloromethane extract only showed mutagenic activity in TA98 (7). In this extract, there is a prevalence of naphthopyranones, a class of polyphenolic natural products present in a variety of plant species (29). They have many pharmacological activities, including antitumoral activity (30-35).

Eriocauline was isolated from this extract and showed strong mutagenic activity in strains TA97a and TA102, justifying the results obtained in our previous studies.

Comparing eriocauline (5) with paepalantine and also comparing them with related dimers isolated from species of Eriocaulaceae, it is possible to explain the mutagenic activity induced by this molecule and to establish a structure-activity relationship.

According to Varanda et al (8), the ability of groups at 1, 9 and 10 positions of a naphthopyranone, named “paepalantine”, to form hydrogen bonds with the nitrogen of DNA bases, explains its mutagenic activity. The molecule of paepalantine has a free hydroxyl group at position 9, which is responsible for the mutagenicity observed.

Paepalantine was previously tested with strains TA100, TA98 and TA102 of *S. typhimurium* (8), at concentrations that varied from 2.0 to 128.0 µg/plate, and it gave positive results in all tested strains, but it was not tested before on the TA97a strain. So as to compare the results obtained for this substance with those obtained with other naphthopyranones, paepalantine was now tested on the TA97a (Table 6). This strain in fact gave the most prominent results and showed the highest mutagenic potency: 1809.2 revertants/µg in presence of S9 and 786.1 revertants/µg in absence of S9 (Table 7).

Planifolin was tested in concentrations that varied from 0.24 up to 64.0 µg/plate and showed positive results in strains TA100, TA98 and TA97a and negative results in TA102. The highest mutagenic potency was obtained in the TA97a strain (371.2 revertants/µg), in the presence of S9 (10).

The 8-8' dimer of paepalantine had been tested in concentrations that varied from 8.0 up to 128.0 µg/plate and had shown only negative results in all tested strains (9, 10).

Eriocauline (5) also showed its strongest effect in the TA97a strain and its mutagenic potency was 443.0 revertants/µg.

Eriocauline is a dimer composed of two monomers very similar to the molecule of paepalantine; lacking only two methoxyl radicals at the positions 5 and 5'. Very interestingly, it possesses a spatial geometry very favorable to make hydrogen bonds between its free hydroxyl groups, at positions 9 and 9', and the DNA bases. The hydroxyl group of each monomer finds itself sufficiently removed from the plane of the other monomer to facilitate the linking to the DNA base, which explains why eriocauline is also mutagenic in the direct

form, that is, without needing metabolization. Thus, in the dimer form, it is capable of intercalating with DNA and causing mutations.

Other dimers isolated from species of Eriocaulaceae are planifolin and 8-8' dimer of paepalantine. These dimers were isolated respectively from *P. planifolius* and *P. bromelioides* (36, 37). The mutagenicity of both dimers was also determined by the Ames test and the results showed that only planifolin possesses mutagenic potential (9, 10).

The observed mutagenicity of planifolin can be explained by the spatial conformation of this molecule. Planifolin is an angular molecule (36), but it has free hydroxyl groups, at carbons 10 and 9' positions, next to the planes of the opposing portions of the dimer, which could hinder, or even impede, the interaction of these groups with the DNA bases. Greater mutagenicity was found for this compound when metabolization (S9) was used, very possibly because the monomers were released. The C-O-C link is easily broken and thus the two molecules would be set free: one of semi-vioxanthin and the other paepalantine, which are two naphthopyranones (38). As already mentioned, naphthopyranones have a high mutagenic potential (10), due to their free hydroxyl groups at positions 9 and 10. Both compounds have such free hydroxyl groups in the monomer form, and the binding potential with DNA bases is thus increased, explaining the increased mutagenicity when metabolization was used.

The 8-8' dimer of paepalantine is also an angular molecule but it shows no mutagenic activity. This could be related to the fact that its hydroxyl groups at 9, 9', 10 and 10' are very close to methoxyl groups, which could cause steric hindrance. A resonance can also occur between radicals of this compound, because of their proximity, and that phenomenon would be responsible for the capacity of this molecule to release free radical "nonbonding" electrons, accounting for the high antioxidant capacity of this molecule (38). This dimer is linked by an extremely stable C-C bond, which is very hard to break, even when metabolization occurs. This explains the lack of mutagenicity found, even when the S9 mixture was used.

In the present study, the results obtained regarding the mutagenicity of the enriched fractions of flavonoids and naphthopyranones of the methanol extract and of the isolated flavonoids (**1-4**) and naphthopyranone (**5**) from *E. ligulatum* emphasize the importance of careful assessment of such substances and screening of their interaction with DNA. Clearly, these molecules are promising candidates for future studies with tumor cell lines, in the search for new anticancer agents.

Acknowledgments

Authors are thankful to Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), for funding and the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), for grants to E.A.Varanda and W. Vilegas.

References

- (1) Hamburger, M., Hostetmann, K. (1991) Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine. *Phytochemistry* 30, 3864–3884.
- (2) Weisburger, J. H., Hara, Y., Solan, L., Luo, F. Q., Pittman, B., Zang, E. (1996) Tea polyphenols as inhibitors of mutagenicity of major classes of carcinogens. *Mutat. Res.* 371, 57–63.
- (3) Bae, E. A., Han, M. J., Choo, M. K., Park, S. Y., Kim, D. H. (2002) Metabolism of 20(S)- and 20(R)-ginsenoside R-g3 by human intestinal bacteria and its relation to in vitro biological activities. *Biol. Pharm. Bull.* 25, 58–63.
- (4) Moldenke, N. H. (1971) A fifth summary of the Verbenaceae. In: *Avicenniaceae, Stilbeaceae, Discrastyliaceae, Symphoremaceae, Nyctanthaceae and Eriocaulaceae of the World as to Valid Taxa, Geographic Distribution and Synonymy*. vol. 2, Braun-Brunfield, INC., Ann Arbor.

- (5) Giuliatti, A. M. (1978) Some taxonomic changes in the genus *Eriocaulon* L. *Bol. Bot.* 6, 39-47.
- (6) Santos, L. C., Rodrigues, C. M., Silva, M. A., Coelho, R. G., Sannomiya, M., Vilegas, W. (2005) Chemical profile of *Eriocaulon ligulatum* (Vell.) L. B. Smith (Eriocaulaceae). *Biochem. Syst. Ecol.* 33, 1159-1166.
- (7) Silva, M. A., Oliveira, A. P. S., Sannomiya, M., Sano, P. T., Varanda, E. A., Vilegas, W., Santos, L. C. (2007) Flavonoids and a Naphthopyranone from *Eriocaulon ligulatum* and Their Mutagenic Activity. *Biol. Pharm. Bull.* 55, 1635-1639.
- (8) Varanda, E. A., Raddi, M. S. G., Dias, F. L. P., Araujo, M. C. S., Gibran, S. C. A., Takahashi, C. S., Vilegas, W. (1997) Evaluation of the genotoxic potential of the isocoumarin paepalantine in vivo and in vitro mammalian systems. *Teratogen. Carcinogen. Mutagen.* 17, 85-95.
- (9) Varanda, E. A., Devienne, K. F., Raddi, M. S. G., Furuya, E. M., Vilegas, W. (2004) Mutagenicity of paepalantine dimer and glycoside derivatives from *Paepalanthus bromelioides*. *Toxicol. in Vitro* 18, 109–114.
- (10) Varanda, E. A., Varella, S. D., Rampazo, R. A., Kitagawa, R. R., Raddi, M. S. G., Vilegas, W., Santos, L. C. (2006) Mutagenic and cytotoxic effect of planifolin: A naphthopyranone dimer isolated from *Paepalanthus planifolius*. *Toxicol. in Vitro* 20, 664–668.
- (11) Mortelmans, K., and Zeiger, E. (2000) The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. *Mutat. Res.* 455, 29-60.
- (12) Verschaeve, L., Kestens, V., Yaylor, J. L. S., Elgorashi, E. E., Maes, A., Van Puyvelde, L., De Kimpe, N., Van Staden, J. (2004) Investigation of the antimutagenic effects of selected South African medicinal plant extracts. *Toxicol. in Vitro* 18, 29-35.

- (13) Carneiro, M. R. G., Dias, M. M. D., Oliveira, A. C. A. X., Paumgarten, J. R. F. (2005) Evaluation of mutagenic and antimutagenic activities of -bisabolol in the *Salmonella*/microsome assay. *Mutat. Res.* 585, 105–112.
- (14) Leite, A. C. L., Vieira, R. F. F., Moreira, D. R. M., Brondani, D. J., Srivastava, R. M., Silva, V. F., Morais Jr., M. A. (2005) Genotoxic activity of 3-[3-phenyl-1,2,4-oxadiazol-5-yl] propionic acid and its peptidyl derivatives determined by Ames and SOS response tests. *Mutat. Res.* 588, 166–171.
- (15) Taira, K., Miyashita, Y., Okamoto, K., Arimoto, S., Takahashi, E., Negishi, T. (2005) Novel antimutagenic factors derived from the edible mushroom *Agrocybe cylindracea*. *Mutat. Res.* 586, 115–123.
- (16) MacGregor, J. T., and Jurd, L. (1978) Mutagenicity of plant flavonoids: structural requirements for mutagenic activity in *Salmonella typhimurium*. *Mutat. Res.* 54, 297-309.
- (17) Nagao, M., Morita, N., Yahagi, T., Shimizu, M., Kuroyanagi, M., Fukuoka, M., Yoshihira, K., Natori, S., Fujino, T., Sugimura T. (1981) Mutagenicities of 61 flavonoids and 11 related compounds. *Environ. Mutagen.* 3, 401-419.
- (18) Czeeczot, H., Tudek, B., Kusztelak, J., Szymczyk, T., Dobrowolska, B., Glinkowska, G., Malinowski, J., Strzelecka, H. (1990) Isolation and studies of the mutagenic activity in the Ames test of flavonoids naturally occurring in medical herbs. *Mutat. Res.* 240, 209-216.
- (19) Sandnes, D., Johansen, T., Teien, G., Ulsaker, G. (1992) Mutagenicity of crude senna and senna glycosides in *Salmonella typhimurium*. *Pharmacol. Toxicol.* 71, 165-172.
- (20) Edenharder, R., Von Petersdorff, I., Rauscher, R. Antimutagenic effects of flavonoids, chalcones and structurally related compounds on the activity of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ) and other heterocyclic amine mutagens from cooked food. *Mutat. Res.* 287, 261-274.
- (21) Wagner, H., Bladt, S., Zgainski, E. M. (1984) *Plant drug analysis*, Springer, Berlin.

- (22) Maron, D. M., and Ames, B. N. (1983) Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat. Res.* 113, 173-215.
- (23) Cardoso, C. R. P., Cólus, I. M. S., Bernardi, C. C., Sannomiya, M., Vilegas, W., Varanda, E. A. (2006) Mutagenic activity promoted by amentoflavone and methanolic extract of *Byrsonima crassa* Niedenzu. *Toxicology* 225, 55-63.
- (24) Bernstein, L., Kaldor, J., Mac Cann, J., Pike, M. C. (1982) An empirical approach to the statistical analysis of mutagenesis data from the *Salmonella* test. *Mutat. Res.* 97, 267-281.
- (25) Park, S., Hahm, K. B., Oh, T. Y., Jin, J. H., Choue, R. (2004) Preventive effect of the flavonoid, wogonin, against ethanol-induced gastric mucosal damage in rats. *Digest. Dis. Sci.* 49, 384-394.
- (26) Toker, G., Kupeli, E., Memisoglu, M., Yesilada, E. (2004) Flavonoids with antinociceptive and anti-inflammatory activities from the leaves of *Tilia argentea* (silver linden). *J. Ethnopharmacol.* 95, 393-397.
- (27) Jurado, J., Alejandre, D. E., Alonso, M. A., Pueyo, C. (1991) Study on the mutagenic activity of 13 bioflavonoids with the *Salmonella* Ara test. *Mutagenesis* 6, 289-295.
- (28) Schimmer, O., Hafele, F. F., Kruger, A. (1988) The mutagenic potencies of plant extracts containing quercetin in *Salmonella typhimurium* TA98 and TA100. *Mutat. Res.* 206, 201-208.
- (29) Hill, R. A. (1986) Naturally occurring isocoumarins. *Fortschr. Chem. Org.* 49, 1-78.
- (30) Cañedo, L. M., Puents, J. L. F., Baz, J. P. (1997) A new isocoumarin antitumor agent produced by a marine bacterium. *J. Antibiot.* 50, 175-176.
- (31) Devienne, K. F., Raddi, M. S. G., Varanda, E. A., Vilegas, W. (2002) In vitro cytotoxicity of some natural and semi-synthetic isocoumarins from *Paepalanthus bromelioides*. *Z. Naturforsch.* 57c, 85-88.

- (32) Di Stasi, L. C., Camuesco, D., Nieto, A., Vilegas, W., Zarzuelo, A., Galvez, J. (2004) Intestinal anti-inflammatory activity of paepalantine, an isocoumarin isolated from the capitula of *Paepalanthus bromelioides* in the trinitrobenzenesulphonic acid model of rat colitis. *Planta Med.* 70, 315-320.
- (33) Kostova, I. (2005) Synthetic and natural coumarins as cytotoxic agents. *Curr. Med. Chem. Anticancer Agents* 5, 29–46.
- (34) Devienne, K. F., Raddi, M. S. G., Coelho, R. G., Vilegas, W. (2005) Structure–antimicrobial activity of some natural isocoumarins and their analogues. *Phytomedicine* 12, 378–381.
- (35) Okamoto, T., Kobayshi, T., Yoshida, S. (2005) Chemical aspects of coumarin compounds for the prevention of hepatocellular carcinomas. *Curr. Med. Chem.* 5, 47–51.
- (36) Santos, L. C., Piacente, S., Pizza, C., Albert, K., Dachtler, M., Vilegas, W. (2001) Planifolin, a new naphthopyranone dimer and flavonoids from *Paepalanthus planifolius*. *J. Nat. Prod.* 64, 122-124.
- (37) Coelho, R. G., Vilegas, W., Devienne, K. F., Raddi, M. S. G. (2000) A new cytotoxic naphthopyrone dimer from *Paepalanthus bromelioides*. *Fitoterapia* 71, 497-500.
- (38) Devienne, K. F., Cálgaro-Helena, A. F., Dorta, D. J., Prado, I. M. R., Raddi, M. S. G., Vilegas, W., Uyemura, S. A., Santos, A. C., Curti, C. (2007) Antioxidant activity of isocoumarins isolated from *Paepalanthus bromelioides* on mitochondria. *Phytochemistry* 68, 1075–1080.

Table 1. Mutagenic activity expressed as the mean and standard deviation of the number of revertants/plate in bacterial strains TA98, TA100, TA97a and TA102 exposed to enriched fractions (**GF** and **GAFN**) of methanol extract of *E. ligulatum*, at various doses, with (+S9) or without (-S9) metabolic activation.

Revertants/plate in <i>Salmonella typhimurium</i> strains								
Treatment mg/plate	TA 100		TA 98		TA 97a		TA 102	
GF	- S9 ^c	+ S9 ^b	- S9 ^a	+ S9 ^b	- S9 ^a	+ S9 ^b	- S9 ^d	+ S9 ^b
0	179 ± 17	166 ± 18	23 ± 5	36 ± 7	141 ± 26	143 ± 17	276 ± 8	313 ± 15
0.4	192 ± 18 (1.1)	158 ± 16 (1.0)	29 ± 1 (1.3)	29 ± 8 (0.8)	180 ± 38 (1.3)	157 ± 16 (1.1)	305 ± 64 (1.1)	334 ± 18 (1.1)
0.8	174 ± 10 (1.0)	185 ± 13 (1.1)	26 ± 4 (1.1)	36 ± 9 (1.0)	208 ± 47 (1.5)	133 ± 40 (0.9)	296 ± 17 (1.1)	356 ± 43 (1.1)
1.5	207 ± 20 (1.2)	190 ± 12 (1.1)	28 ± 4 (1.2)	33 ± 7 (0.9)	187 ± 45 (1.3)	165 ± 14 (1.2)	276 ± 30 (1.0)	317 ± 8 (1.0)
3.0	197 ± 9 (1.1)	174 ± 18 (1.0)	30 ± 4 (1.3)	32 ± 4 (0.9)	181 ± 19 (1.3)	149 ± 31 (1.0)	204 ± 1 (0.7)	320 ± 29 (1.0)
4.6	211 ± 3 (1.2)	189 ± 19 (1.1)	26 ± 5 (1.1)	32 ± 4 (0.9)	185 ± 42 (1.3)	128 ± 11 (0.9)	181 ± 7 (0.7)	335 ± 33 (1.1)
GAFN								
0	143 ± 24	166 ± 18	23 ± 5	36 ± 7	141 ± 26	143 ± 17	348 ± 33	313 ± 15
0.6	155 ± 8 (1.1)	216 ± 16 (1.3)	23 ± 5 (1.0)	34 ± 1 (0.9)	253 ± 36 (1.8)	261 ± 43 (1.8)*	427 ± 5 (1.2)	491 ± 55 (1.6)*
1.1	155 ± 36 (1.1)	263 ± 42 (1.6)	26 ± 2 (1.1)	34 ± 9 (0.9)	235 ± 35 (1.7)	297 ± 30(2.1)**	413 ± 9 (1.2)	522 ± 49(1.7)**
2.2	159 ± 6 (1.1)	309 ± 48 (1.9)*	27 ± 5 (1.2)	34 ± 3 (0.9)	255 ± 14 (1.8)*	276 ± 36 (1.9)*	473 ± 20 (1.4)	547 ± 61(1.8)*
4.5	143 ± 14 (1.0)	266 ± 37 (1.6)*	30 ± 6 (1.3)	24 ± 4 (0.7)	280 ± 15 (2.0)*	295 ± 22(2.1)**	453 ± 26 (1.3)	758 ± 2 (2.4)**
6.7	153 ± 4 (1.1)	262 ± 15 (1.6)*	30 ± 5 (1.3)	39 ± 8 (1.1)	319 ± 23 (2.3)*	262 ± 60 (1.8)	428 ± 41 (1.3)	695 ± 51(2.2)**
Control +	2592 ± 233	3453 ± 65	2866 ± 822	1763 ± 67	1430 ± 123	2271 ± 90	2401 ± 324	2335 ± 312

GF: Glycosylated flavonoids; GAFN: Glycosylated flavonoids + Aglycone flavonoids + Naphthopyranones; 0 = negative control (DMSO, 100 µL/plate). Control +: Positive control: a) 4-nitro-*O*-phenylenediamine (10.0 µg/plate); b) 2-anthramine (1.25 µg/plate); c) sodium azide (1.25 µg/plate); d) mitomycin (0.5 µg/plate). * $p \leq 0.05$ (ANOVA), ** $p \leq 0.01$ (ANOVA). The values in brackets = mutagenic index.

Table 2. Mutagenic activity expressed as the mean and standard deviation of the number of revertants/plate in bacterial strains TA98, TA100, TA97a and TA102 exposed to enriched fraction (AFN) of methanol extract of *E. ligulatum*, at various doses, with (+S9) or without (-S9) metabolic activation.

Revertants/plate in <i>Salmonella typhimurium</i> strains								
Treatment mg/plate	TA 100		TA 98		TA 97a		TA 102	
AFN	- S9 ^c	+ S9 ^b	- S9 ^a	+ S9 ^b	- S9 ^a	+ S9 ^b	- S9 ^d	+ S9 ^b
0	179 ± 17	166 ± 18	23 ± 5	33 ± 4	141 ± 26	143 ± 17	348 ± 33	313 ± 15
0.1	198 ± 9 (1.1)	197 ± 26 (1.2)	28 ± 6 (1.2)	39 ± 5 (1.2)	200 ± 18 (1.4)	200 ± 33 (1.4)	436 ± 22 (1.3)	469 ± 45 (1.5)*
0.2	195 ± 16 (1.1)	192 ± 22 (1.2)	26 ± 2 (1.1)	42 ± 8 (1.3)	192 ± 15 (1.4)	189 ± 48 (1.3)	329 ± 24 (1.0)	567 ± 39 (1.8)**
0.4	182 ± 13 (1.0)	215 ± 6 (1.3)	28 ± 3 (1.2)	38 ± 6 (1.2)	235 ± 38 (1.7)	215 ± 9 (1.5)	211 ± 13 (0.6)	545 ± 54 (1.7)**
0.8	155 ± 15 (0.9)	242 ± 10 (1.5)	25 ± 2 (1.1)	37 ± 6 (1.1)	220 ± 27 (1.6)	212 ± 11 (1.5)	188 ± 13 (0.5)	602 ± 58 (1.9)**
1.2	----	222 ± 13 (1.3)	24 ± 4 (1.0)	28 ± 3 (0.9)	267 ± 29 (1.9)*	186 ± 12 (1.3)	208 ± 14 (0.6)	649 ± 4 (2.1)**

AFN: Aglycone flavonoids + naphthopyranones; 0 = negative control (DMSO, 100 µL/plate). Control +: Positive control: a) 4-nitro-*O*-phenylenediamine, (10.0 µg/plate);

b) 2-anthramine (1.25 µg/plate); c) sodium azide (1.25 µg/plate); d) mitomycin (0.5 µg/plate). * $p \leq 0.05$ (ANOVA), ** $p \leq 0.01$ (ANOVA). The values in brackets = mutagenic index.

Table 3. Mutagenic activity expressed as the mean and standard deviation of the number of revertants/plate in bacterial strains TA97a and TA102 exposed to isolated substances (**1** and **2**) of methanol extract of *E. ligulatum*, at various doses, with (+S9) or without (-S9) metabolic activation.

Revertants/plate in <i>Salmonella typhimurium</i> strains				
Treatment µg/plate	TA 97a		TA 102	
(1)	- S9 ^a	+ S9 ^b	- S9 ^c	+ S9 ^b
0	167 ± 9	125 ± 18	326 ± 22	252 ± 47
10.8	279 ± 37 (1.7)	291 ± 18 (2.3)**	346 ± 1 (1.1)	454 ± 148 (1.8)
21.6	273 ± 32 (1.6)	283 ± 19 (2.3)**	351 ± 23 (1.1)	547 ± 5 (2.2)**
43.3	332 ± 21 (2.0)*	309 ± 28 (2.5)**	338 ± 1 (1.0)	561 ± 99 (2.2)*
86.5	215 ± 32 (1.3)	-----	359 ± 7 (1.1)	-----
129.8	198 ± 21 (1.2)	-----	308 ± 24 (1.0)	-----
(2)	- S9 ^a	+ S9 ^b	- S9 ^c	+ S9 ^b
0	141 ± 26	125 ± 18	268 ± 5	252 ± 47
29.6	156 ± 0 (1.1)	287 ± 7 (2.3)**	435 ± 26 (1.6)*	615 ± 63 (2.4)**
59.3	141 ± 14 (1.0)	253 ± 46 (2.0)*	437 ± 25 (1.6)*	435 ± 84 (1.8)
118.5	162 ± 13 (1.2)	274 ± 55 (2.2)*	450 ± 3 (1.7)*	512 ± 62 (2.0)*
237.0	158 ± 21 (1.1)	-----	471 ± 212 (1.8)	-----
355.5	144 ± 2 (1.1)	-----	440 ± 15 (1.6)*	-----

(1): 6-methoxyapigenin; (2): 6-methoxyapigenin-7-*O*-β-D-glucopyranoside; 0 = negative control (DMSO, 100 µL/plate).

Control +: Positive control: a) 4-nitro-*O*-phenylenediamine (10.0 µg/plate); b) 2-anthramine (1.25 µg/plate); c) mitomycin (0.5 µg/plate). * $p \leq 0.05$ (ANOVA), ** $p \leq 0.01$ (ANOVA). The values in brackets = mutagenic index.

Table 4. Mutagenic activity expressed as the mean and standard deviation of the number of revertants/plate in bacterial strains TA97a and TA102 exposed to isolated substances (**3** and **4**) of methanol extract of *E. ligulatum*, at various doses, with (+S9) or without (-S9) metabolic activation.

Revertants/plate in <i>Salmonella typhimurium</i> strains				
Treatment µg/plate	TA 97a		TA 102	
(3)	- S9 ^a	+ S9 ^b	- S9 ^c	+ S9 ^b
0	141 ± 26	125 ± 18	268 ± 5	252 ± 47
27.0	185 ± 6 (1.3)	283 ± 26 (2.3)**	443 ± 38 (1.7)*	518 ± 56 (2.1)*
54.0	127 ± 37 (0.9)	284 ± 25 (2.3)**	431 ± 10 (1.6)*	477 ± 60 (1.9)*
108.0	141 ± 12 (1.0)	256 ± 20 (2.1)**	451 ± 3 (1.7)*	504 ± 11 (2.0)**
216.0	226 ± 35 (1.6)	-----	435 ± 16 (1.6)*	-----
324.0	194 ± 7 (1.4)	-----	325 ± 73 (1.2)	-----
(4)	- S9 ^a	+ S9 ^b	- S9 ^c	+ S9 ^b
0	167 ± 9	125 ± 18	326 ± 22	252 ± 47
8.2	284 ± 9 (1.7)*	271 ± 9 (2.2)**	312 ± 33 (1.0)	515 ± 40 (2.0)**
16.4	293 ± 16 (1.8)*	285 ± 46 (2.3)*	357 ± 15 (1.1)	546 ± 80 (2.2)*
32.7	284 ± 41 (1.7)*	299 ± 21 (2.4)**	397 ± 7 (1.2)	571 ± 150 (2.3)
65.5	175 ± 45 (1.1)	-----	339 ± 23 (1.0)	-----
98.3	145 ± 13 (0.9)	-----	276 ± 33 (0.9)	-----

(3): methoxyapigenin-7-*O*-β-D-allopyranoside; (4): 6,4'-dimethoxyquercetin-3-*O*-β-D-6''[3,4,5-trihydroxy(*E*)-cinnamoyl]glucopyranoside; 0 = negative control (DMSO, 100 µL/plate). Control +: Positive control: a) 4-nitro-*O*-phenylenediamine (10.0 µg/plate); b) 2-anthramine (1.25 µg/plate); c) mitomycin (0.5 µg/plate). * $p \leq 0.05$ (ANOVA), ** $p \leq 0.01$ (ANOVA). The values in brackets = mutagenic index.

Table 5. Mutagenic activity expressed as the mean and standard deviation of the number of revertants/plate in bacterial strains TA97a and TA102 exposed to isolated substance (5) of dichloromethane extract of *E. ligulatum*, at various doses, with (+S9) or without (-S9) metabolic activation

Revertants/plate in <i>Salmonella typhimurium</i> strains				
Treatment µg/plate	TA 97a		TA 102	
(5)	- S9 ^a	+ S9 ^b	- S9 ^c	+ S9 ^b
0	121 ± 10	177 ± 5	268 ± 5	239 ± 27
1.3	645 ± 35 (5.3)**	244 ± 20 (1.4)*	345 ± 21 (1.3)	-----
2.5	2108 ± 367 (17.4)**	303 ± 0 (1.7)**	335 ± 10 (1.3)	339 ± 45 (1.4)
5.0	3333 ± 733 (27.5)**	605 ± 3 (3.4)**	314 ± 54 (1.2)	375 ± 83 (1.6)
7.5	4545 ± 390 (37.6)**	833 ± 17 (4.7)**	392 ± 35 (1.5)	432 ± 81 (1.8)
15.0	5067 ± 48 (41.9)**	1294 ± 80 (7.3)**	474 ± 60 (1.8)*	491 ± 14 (2.1)**
Control +	955 ± 82	2174 ± 348	4031 ± 26	3976 ± 252

(5): Eriocauline; 0 = negative control (DMSO, 100 µL/plate). Control +: Positive control: a) 4-nitro-*O*-phenylenediamine, (10.0 µg/plate); b) 2-anthramine (1.25 µg/plate); c) mitomycin (0.5 µg/plate). * $p \leq 0.05$ (ANOVA), ** $p \leq 0.01$ (ANOVA).

The values in brackets = mutagenic index.

Table 6. Mutagenic activity expressed as the mean and standard deviation of the number of revertants/plate in bacterial strain TA97a exposed to **paepalantine** isolated from an extract of *P.vellozioides*, at various doses, with (+S9) or without (-S9) metabolic activation

Revertants/plate in <i>Salmonella typhimurium</i> strain		
Treatment µg/plate	TA 97a	
Paepalantine	- S9 ^a	+ S9 ^b
0	167 ± 8	217 ± 8
0.06	269 ± 19 (1.6)**	252 ± 7 (1.2)*
0.12	367 ± 37 (2.2)**	271 ± 19 (1.3)*
0.25	633 ± 140 (3.8)*	338 ± 37 (1.6)*
0.50	745 ± 9 (4.5)**	706 ± 171 (3.3)*
1.0	1284 ± 112 (7.7)**	962 ± 58 (4.4)**
Control +	907 ± 165	3122 ± 190

0 = negative control (DMSO, 100 µL/plate). Control +: Positive control: a) 4-nitro-*O*-phenylenediamine (10.0 µg/plate); b) 2-anthramine (1.25 µg/plate); * $p \leq 0.05$ (ANOVA), ** $p \leq 0.01$ (ANOVA). The values in brackets = mutagenic index.

Table 7. Mutagenic activity expressed as potency (number of revertants/µg) in *Salmonella typhimurium* strains exposed to substances isolated from Eriocaulaceae family plant extracts, with (+S9) or without (-S9) metabolic activation.

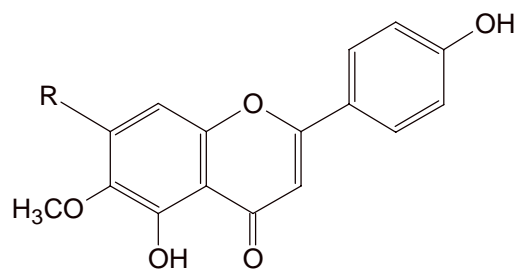
Mutagenic potency in <i>S. typhimurium</i> strains								
Substances	TA 100		TA 98		TA 97a		TA 102	
	- S9	+ S9	- S9	+ S9	- S9	+ S9	- S9	+ S9
Paepalantine	27.3	23.8	9.4	4.9	1809.2	786.1	-	156.6
8-8' dimer of paepalantine	-	-	-	-	-	-	-	-
Planifolin	42.5	31.3	2.19	13.2	-	371.2	-	-
Eriocauline	ND	ND	ND	ND	443.0	50.8	-	17.5

-: negative result; ND: not determined.

Legends of figures

Figure 1. Compounds isolated from *E. ligulatum*.

Figure 2. Naphthopyranones isolated from plants of the Eriocaulaceae family.

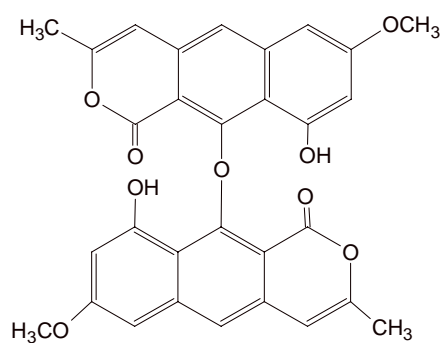
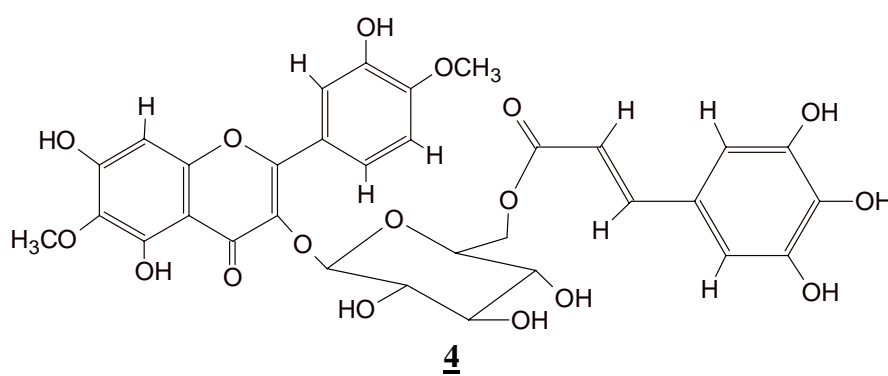


Compounds

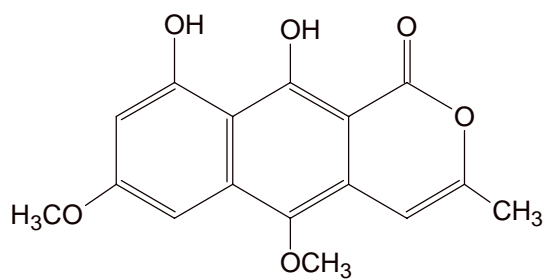
1
2
3

R

OH
O-Glc
O-Allo

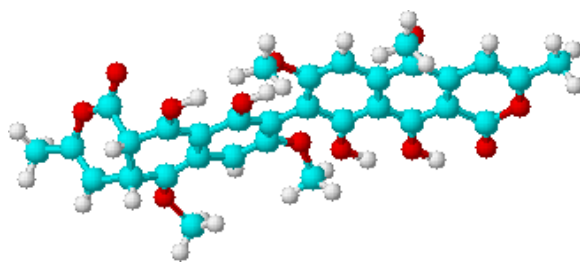


5

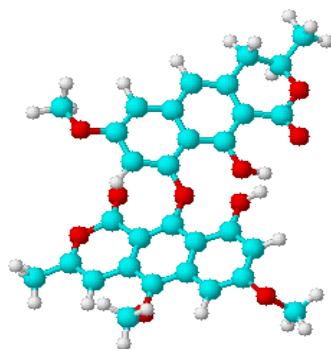


Paepalantine

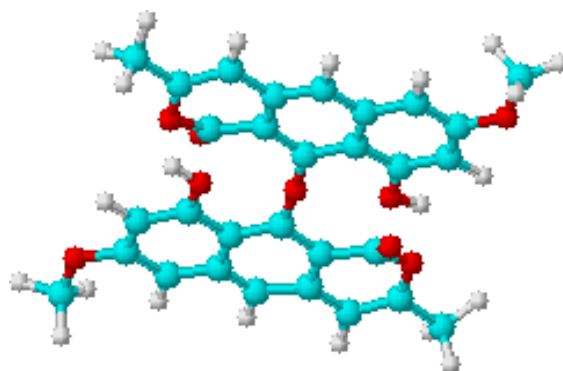
Figure 1



8-8' dimer of Paepalantine



Planifolin



Eriocauline

Figure 2

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Anexo I – Meios e soluções utilizadas para o ensaio RYA.

• **Meio YPD**

YPD	1 L	200 mL
Extrato levedura	10 g	2 g
Peptona	20 g	4 g
Água MiliQ	900 mL	150 mL
Glicose 40%	50 mL	10 mL
OBS: Ajustar o pH para 5,5 com HCl antes de completar o volume com água (1 L no final). Autoclavar 15 min.		
Para meio sólido acrescentar ágar (20 g/L e 4 g/200 mL)		

• **Meio Mínimo (MM)**

Para meio líquido:	1 L	200 mL
Yeast Nitrogen Base	1,7 g	0,34 g
Sulfato de Amônio (NH ₄) ₂ SO ₄	5 g	1 g
Água MiliQ	1,0 L	200 mL
Adicionar (soluções preparadas e autoclavadas separadamente):		
Glicose 40%	50 mL	10 mL
* Metionina 10%	1 mL	200 µL
* Histidina 10%	1 mL	200 µL
OBS: Ajustar o pH para 5,5 com HCl antes de completar o volume com água (1 L no final). Autoclavar 15 min.		
Para meio sólido:		
Agar	20 g (1 L = 33 placas)	4 g

*** Metionina e Histidina 10%:**

$$\begin{array}{l} 10 \text{ g} \text{ ----- } 100 \text{ mL} \\ X \text{ ----- } 1 \text{ mL} \end{array}$$

$$X = 0,1 \text{ g/ mL}$$

• **MuGal**

MuGal	100 mL	10 mL
Tampão Z	100 mL	10 mL
** Triton X – 100 10%	1 mL	100 µL
*** SDS 10%	1 mL	100 µL
Mercaptoetanol (Usar na capela)	70 uL	7 µL
MuGal	21 mg	2,1 mg ou 0,0021 g

**** Triton X – 100 10% (líquido):**

$$\begin{array}{l} 10 \text{ mL} \text{ ----- } 100 \text{ mL água} \\ X \text{ ----- } 1 \text{ mL} \\ X = 0,1 \text{ mL ou } 100 \text{ }\mu\text{L} \end{array}$$

Para fazer 1 mL de Triton X – 100 10%: colocar 100 μL de Triton X em 900 μL de água destilada.

***** SDS 10% (em pó):**

$$\begin{array}{l} 10 \text{ g} \text{ ----- } 100 \text{ mL água} \\ X \text{ ----- } 1 \text{ mL} \\ X = 0,1 \text{ g ou } 100 \text{ mg} \end{array}$$

Para fazer 1 mL de SDS 10%: colocar 100 mg de SDS em 1 mL de água destilada.

- **Tampão Z**

Tampão Z	1 L	100 mL
Na_2PO_4 – 60 mM	8,52 g	0,85 g
NaH_2PO_4 – 40 mM	5,52 g	0,55 g
KCl – 10 mM	0,75 g	0,075 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$ – 1 mM	12,32 g em 50 mL H_2O – usar 1 mL	0,25 g em 1 mL H_2O – usar 100 μL
Água MiliQ	900 mL (completar para 1 L)	90 mL (completar para 100 mL)
Ajustar o pH para 7,0 (se precisar) com HCl antes de completar o volume de água. Não precisa autoclavar		

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](#)