



## ARTIGO

### Atividade genotóxica de extratos etanólicos de plantas do gênero *Ocotea*

Zaira da Rosa Guterres<sup>1</sup>, Ana Francisca Gomes da Silva<sup>1\*</sup>, Maria José de Camargo<sup>2</sup>,  
Cláudio Rodrigo Nogueira<sup>2</sup>, Fernanda Rodrigues Garcez<sup>2</sup>, Walmir Silva Garcez<sup>2</sup> e Mário Antônio Spanó<sup>3</sup>

Recebido: 27 de junho de 2011    Recebido após revisão: 01 de abril de 2012    Aceito: 10 de abril de 2012  
Disponível on-line em <http://www.ufrgs.br/seerbio/ojs/index.php/rbb/article/view/1952>

**RESUMO:** (Atividade genotóxica de extratos etanólicos de plantas do gênero *Ocotea*). Plantas do gênero *Ocotea* são comumente utilizadas pela população como medicamento, porém são escassas as pesquisas sobre a atividade genotóxica de extratos e compostos químicos obtidos de plantas desse gênero. No presente trabalho foi avaliado o potencial genotóxico (mutagênico e recombinogênico) de extratos etanólicos obtidos das folhas de *Ocotea acutifolia*, *Ocotea lancifolia* e *Ocotea minarum*, que ocorrem no estado de Mato Grosso do Sul. A atividade genotóxica destas plantas foi investigada por meio do SMART (Somatic Mutation And Recombination Test) em células de asas de *Drosophila melanogaster*. Nas concentrações testadas os extratos de *O. lancifolia* e *O. minarum* não apresentaram atividade genotóxica, por outro lado o extrato de *O. acutifolia* demonstrou elevado potencial genotóxico e induziu altas frequências de recombinação mitótica. Esta diferença de atividade parece estar relacionada à concentração e as distintas classes de metabólitos secundários encontradas em cada extrato. O pronunciado potencial genotóxico apresentado por *O. acutifolia* demonstra que, apesar do uso frequente de plantas do gênero *Ocotea*, são imprescindíveis estudos farmacológicos destas e outras espécies de plantas, a fim de caracterizar os possíveis efeitos adversos.

**Palavras-chave:** Mutagenicidade, recombinação mitótica, SMART, *Drosophila melanogaster*.

**ABSTRACT:** (Genotoxic activity of ethanol extracts plants of the genus *Ocotea*). *Ocotea* are commonly used by population as a medicine, however there are few research is on the genotoxic activity of extracts and compounds obtained from plants of this genus. The present study examined the genotoxic potential (mutagenic and recombinogenic) of ethanol extracts obtained from the leaves of *Ocotea acutifolia*, *Ocotea lancifolia* and *Ocotea minarum* from in Mato Grosso do Sul state. Genotoxic activity of the plants was investigated by the Somatic mutation and Recombination Test (SMART) in wing cells of *Drosophila melanogaster*. Extracts of *O. lancifolia* and *O. minarum* showed no genotoxic activity, at the concentrations used. Otherside, the extract of *O. acutifolia* showed higher genotoxic potential and induced high frequencies of mitotic recombination. This difference in activity seems to be related to the presence of different classes of secondary metabolites and their concentrations in each extract. The pronounced genotoxic potential presented by *O. acutifolia* showed that, despite the frequent use of plants of the genus *Ocotea* pharmacological studies of these and other plant species are essential in order to characterize the possible adverse effects.

**Key words:** Mutagenic, recombination mitotic, SMART, *Drosophila melanogaster*.

## INTRODUÇÃO

O uso de plantas como recurso terapêutico é uma prática comum na medicina popular e tem aumentado acentuadamente nas últimas décadas. Apesar da ampla utilização das plantas medicinais, poucos estudos toxicológicos e genotóxicos de extratos e metabólitos secundários, são encontrados para plantas pertencentes ao gênero *Ocotea*, o que pode significar maior potencial de risco à saúde humana, uma vez que algumas plantas podem apresentar propriedades tóxicas e genotóxicas (Marques *et al.* 2003).

Espécies do gênero *Ocotea*, um dos mais expressivos da família Lauraceae, apresentam ampla dispersão no cerrado brasileiro e muitas delas são empregadas na medicina popular como anti-reumática, depurativas, tônicas e sudoríferas (Moraes 2005).

Representantes deste gênero produzem diversos metabólitos secundários destacando-se os alcalóides, lignanas e neolignanas (Funasaki *et al.* 2009, Zanin & Lordello 2007, Silva *et al.* 2002), os quais comumente apresentam diferentes bioatividades, tais como citotóxica (Garcez *et al.* 2011, Hoet *et al.* 2004), antiinflamatória (Zschocke *et al.* 2000a,b), antiprotozoal (Fournet *et al.* 2007), e preventivas contra agregação plaquetária *in vitro* (Tognolini *et al.* 2006).

Sendo assim, as espécies de ocorrência em Mato Grosso do Sul, *Ocotea acutifolia* (Nees) Mez, *Ocotea lancifolia* (Schott) Mez e *Ocotea minarum* (Meissn) Mez, tiveram seus estudos químicos realizados e a partir de *O. acutifolia*, foram isolados além de um alcalóide morfínano, vários alcalóides aporfínóides, entre eles: ocoteína, dicentrina e talicminina, (Garcez *et al.* 2011),

1. Unidade Universitária de Mundo Novo, Grupo de Estudo de Ciências Ambientais e Educação (GEAMBE), Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul (UEMS). BR 163, Km 20,2. CEP 79980-000, Mundo Novo, Mato Grosso do Sul, Brasil.

2. Departamento de Química, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS). Av. Senador Filinto Müller, 1555, Cidade Universitária, CEP 79074-460, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil.

3. Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia (UFU). Av. Pará, 1720, Campus Umuarama, CEP 38400-902, Uberlândia, Minas Gerais, Brasil.

\*Autor para contato. E-mail: [ana.francisca@ig.com.br](mailto:ana.francisca@ig.com.br)

de *O. lancifolia*, sesquiterpenos e flavonóides (Camargo et al. 2009) e de *O. minarum* nor- e sesquiterpenos e lactona terpênica (Nogueira et al. 2007). Entretanto, verificou-se que não há relatos sobre a possível atividade genotóxica de extratos e metabólitos obtidos de plantas deste gênero.

Portanto, o presente trabalho avaliou o potencial genotóxico de extratos etanólicos obtidos de folhas de *O. acutifolia*, *O. lancifolia* e *O. minarum*, coletadas na região centro-sul de Mato Grosso do Sul por meio do teste SMART em células de asas de *Drosophila melanogaster*.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Coleta e Identificação

As folhas de *O. acutifolia*, *O. lancifolia* e *O. minarum* foram coletadas na região centro-sul de Mato Grosso do Sul em março de 2006. A identificação das plantas foi realizada por Dr. João Baitello (Instituto Florestal de São Paulo, SP), Dra. Ubirazilda Maria Resende e MSc. Flávio Macedo Alves (DBI/UFMS). As exsiccatas de *O. acutifolia*, *O. lancifolia* e *O. minarum* sob os respectivos números 15441, 3670 e 11467 foram depositadas no herbário CGMS da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, MS, Brasil.

### Obtenção e preparação dos extratos

O material vegetal foi submetido à secagem ao ar, moído e posteriormente extraído exaustivamente com etanol, a frio. O extrato resultante de cada espécie foi filtrado e concentrado sob pressão reduzida até consistência xaroposa, fornecendo os extratos etanólicos brutos das folhas de *O. acutifolia*, *O. lancifolia* e *O. minarum*. Estes extratos foram submetidos à análise da composição química, das quais foram isolados e identificados diferentes metabólitos secundários (Garcez et al. 2011, Camargo et al. 2009, Nogueira et al. 2007). Posteriormente, para a utilização no ensaio SMART, parte desses extratos foram diluídos com 1% de tween-80, 3% de etanol e água destilada estéril.

### Avaliação da atividade genotóxica

A avaliação da atividade genotóxica (mutagênica e recombinogênica) foi realizada utilizando-se o teste para detecção de mutação e recombinação somática (Somatic Mutation and Recombination Test - SMART) em células de asas de *Drosophila melanogaster*, nos cruzamentos ST e HB.

### Agentes Químicos

Cloridrato de doxorubicina (DXR) (Biorrub® - Biosintética Ltda., São Paulo, Brasil CAS N° 23214-92-8) obtido do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia (MG), Brasil.

### Determinação da Dose Letal

Em experimento piloto determinou-se a dose letal

para 50% dos indivíduos ( $DL_{50}$ ) tratados com os extratos etanólicos, para tanto foram utilizados 100 indivíduos distribuídos em grupos de 20 em cinco repetições. Para os extratos de *O. lancifolia* e *O. minarum*, a toxicidade encontrada foi de 20 mg/mL para moscas adultas, enquanto que, para o extrato de *O. acutifolia* foi de 5 mg/mL.

### Linhagens de *Drosophila* e Cruzamentos

Foram utilizadas três linhagens portadoras dos marcadores recessivos das células das asas de *Drosophila melanogaster*: 1) linhagem *multiple wing hairs* (*mwh*) com constituição genética *y; mwh jv*; 2) linhagem *flare* com constituição genética *flr<sup>3</sup> / In(3LR)TM3, ri p<sup>o</sup> sep l(3)89Aa bx<sup>34e</sup> e Bd<sup>S</sup>*; 3) linhagem “*ORR; flare-3*” (*ORR; flare-3*) com constituição genética *ORR; flr<sup>3</sup> / In(3LR)TM3, ri p<sup>o</sup> sep l(3)89Aa bx<sup>34e</sup> e Bd<sup>S</sup>*. O cruzamento padrão (ST, *standard cross*) foi realizado com fêmeas virgens *flare* cruzadas com machos *mwh* e o cruzamento de alta bioativação metabólica (HB, *high bioactivation cross*) foi realizado com fêmeas virgens ORR cruzadas com machos *mwh* (Graf et al. 1984, Graf & Van Schaik 1992).

Os ovos foram coletados durante um período de 8 horas em frascos contendo uma base sólida de ágar (3% w/v), coberta com uma camada de fermento biológico suplementado com sacarose. Após  $72 \pm 4$  horas, as larvas foram lavadas em água corrente e coletadas com o auxílio de uma peneira de malha fina e transferidas para frascos contendo 1,5 g de meio de cultura alternativo (purê de batata instantâneo Yoki®, Yoki Alimentos S.A., São Bernardo do Campo, SP, Brasil) hidratado com soluções contendo diferentes concentrações finais (0,625; 1,25 e 2,50 mg/mL) de extratos etanólicos (EE) obtidos das folhas de *O. acutifolia* (EEOA), *O. lancifolia* (EEOL) e *O. minarum* (EEOM).

Como controle negativo foi utilizado o solvente (1% de tween-80, 3% de etanol em água destilada estéril) e como controle positivo a DXR (0,125 mg/mL). Os tratamentos foram realizados por um período de aproximadamente 48 horas (tratamento crônico). Adultos emergentes portadores dos dois tipos de genótipos trans-heterozigotos marcados (MH) (genótipo *mwh + / + flr<sup>3</sup>*) e heterozigotos balanceados (BH) (genótipo *mwh + / + TM3, Bd<sup>S</sup>*) foram coletados e fixados em etanol 70%. As asas foram montadas entre lâminas e lamínulas com solução de Faure e analisadas, quanto à ocorrência de diferentes tipos de manchas mutantes, em microscópios ópticos, com magnificação de 400x.

### Análise estatística

Para a avaliação dos efeitos genotóxicos, as frequências de manchas mutantes observadas por mosca, de cada série tratada, foram comparadas com as frequências observadas no controle negativo. As comparações estatísticas foram feitas por meio do programa SMART de computador, o qual utiliza o teste

do  $\chi^2$  para proporções, de acordo com Frei & Würgler (1988).

Para a análise estatística final de todos os resultados positivos, o teste não paramétrico de Mann-Whitney  $U$ -test com níveis de significância  $\alpha = \beta = 0,05$  foi utilizado com o objetivo de excluir falsos positivos (Frei & Würgler 1995). Com base na frequência de indução de manchas por  $10^5$  células, a atividade recombinogênica foi calculada como: frequência de mutação ( $F_M$ ) = frequência de manchas observadas em moscas BH / frequência de manchas observadas em moscas MH; frequência de recombinação ( $F_R$ ) =  $1 - F_M$ ; Frequência total de manchas ( $F_T$ ) = total de manchas observadas nas moscas MH (considerando manchas *mwh* e *ftr*<sup>3</sup>) / N° de moscas; mutação =  $F_T \times F_M$ ; recombinação =  $F_T \times F_R$  (Sinigaglia *et al.* 2006).

## RESULTADOS

Neste estudo, os resultados obtidos com os indivíduos MH (*mwh/ftr*<sup>3</sup>) dos cruzamentos ST e HB, tratados com soluções contendo concentrações finais (0,625; 1,25 e 2,50 mg/mL) de EEOL e EEOM estão relacionados nas Tabelas 1 e 2. No cruzamento ST a frequência total de manchas por indivíduo observada no controle negativo foi de 0,32, enquanto que nos tratados com o EEOL as frequências de mutações variaram de 0,32 a 0,37. Para o EEOM as frequências variaram de 0,23 a 0,32. No cruzamento HB, a frequência total de manchas por indivíduo observada no controle negativo foi de 0,50, enquanto que os tratados com o EEOL e EEOM apresentaram frequências que variaram de 0,40 a 0,52 e 0,32 a 0,45, respectivamente.

Quando foram calculadas as frequências de mutações por indivíduos MH do cruzamento ST tratados com EEOA, verificou-se que as concentrações de 1,25

e 2,50 mg/mL induziram, respectivamente, um aumento de mutações de 0,92 e 1,05, quando comparado com o controle negativo (0,57) (Tab. 3). Resultado similar foi obtido no cruzamento HB, onde os indivíduos apresentaram frequências de mutações que variaram de 1,17 na concentração 0,625 mg/mL a 1,67 na concentração 2,50 mg/mL, estes resultados diferem estatisticamente do observado no controle negativo (0,65) (Tab. 4).

As frequências de mutações obtidas nos indivíduos BH (*mwh/TM3*) do cruzamento ST tratados com as concentrações de 0,625; 1,25 e 2,50 mg/mL de EEOA, variaram de 0,22 a 0,27 (Tab. 3). Nos descendentes BH do cruzamento HB tratados nas três concentrações de EEOA as frequências de mutações variaram de 0,67 a 0,70 (Tab. 4).

Os indivíduos resultantes do cruzamento ST, tratados com as concentrações de 1,25 e 2,50 mg/mL do EEOA apresentaram 100% de recombinação (Tab. 3), entretanto, nos descendentes do cruzamento HB a recombinação variou de 33 a 59%, respectivamente para as concentrações de 0,625 a 2,50 mg/mL (Tab. 4).

## DISCUSSÃO

Os grupos tratados com EEOL e EEOM apresentaram frequências de mutações que não diferem estatisticamente das observadas para os controles negativos nos cruzamentos ST e HB ( $\alpha > 0,05$ ) de acordo com Frei & Würgler (1988), tabelas 1 e 2. Estes resultados nos permitem concluir que, nas condições experimentais, os respectivos extratos não apresentam efeitos genotóxicos diretos ou indiretos.

Uma vez que extratos são misturas complexas, com grande número de compostos químicos diferentes, estes resultados podem estar relacionados aos grupos de metabólitos secundários e às concentrações destes pre-

**Tabela 1.** Frequências de manchas mutantes observadas em asas de descendentes trans-heterozigotos marcados (*mwh/ftr*<sup>3</sup>) de *D. melanogaster* do cruzamento padrão (ST) após tratamento crônico com extratos etanólicos de folhas de *O. lancifolia* (EEOL) e *O. minarum* (EEOM)

| Genótipos<br>Concentrações<br>(mg/mL)   | n° de<br>indivíduos<br>(N) | Manchas por indivíduos (n° manchas) diagnóstico estatístico <sup>a</sup> |      |                                               |      |                    |      |                    |       | Total<br>manchas<br><i>mwh</i> <sup>c</sup><br>(n) |     |
|-----------------------------------------|----------------------------|--------------------------------------------------------------------------|------|-----------------------------------------------|------|--------------------|------|--------------------|-------|----------------------------------------------------|-----|
|                                         |                            | MSP<br>(1-2 céls) <sup>b</sup><br><i>m</i> = 2                           |      | MSG<br>(>2 céls) <sup>b</sup><br><i>m</i> = 5 |      | MG<br><i>m</i> = 5 |      | TM<br><i>m</i> = 2 |       |                                                    |     |
|                                         |                            | F                                                                        | D    | F                                             | D    | F                  | D    | F                  | D     |                                                    |     |
| ST<br><i>mwh/ftr</i> <sup>3</sup><br>CN | 40                         | 0,25                                                                     | (10) | 0,07                                          | (03) | 0,00               | (00) | 0,32               | (13)  |                                                    | 13  |
| DXR (0,125)                             | 40                         | 1,02                                                                     | (41) | +                                             | 2,10 | (84)               | +    | 2,80               | (112) | +                                                  | 231 |
| EEOL (0,625)                            | 40                         | 0,27                                                                     | (11) | -                                             | 0,02 | (01)               | -    | 0,02               | (01)  | -                                                  | 13  |
| EEOL (1,25)                             | 40                         | 0,35                                                                     | (14) | -                                             | 0,00 | (00)               | -    | 0,02               | (01)  | -                                                  | 15  |
| EEOL (2,50)                             | 40                         | 0,30                                                                     | (12) | -                                             | 0,07 | (03)               | -    | 0,00               | (00)  | -                                                  | 15  |
| EEOM (0,625)                            | 40                         | 0,27                                                                     | (11) | -                                             | 0,02 | (01)               | -    | 0,00               | (00)  | -                                                  | 12  |
| EEOM (1,25)                             | 40                         | 0,22                                                                     | (09) | -                                             | 0,05 | (02)               | -    | 0,00               | (00)  | -                                                  | 11  |
| EEOM (2,50)                             | 40                         | 0,30                                                                     | (12) | -                                             | 0,01 | (01)               | -    | 0,00               | (00)  | -                                                  | 13  |

a. Diagnóstico estatístico de acordo com Frei & Würgler (1988). D, diagnóstico estatístico: +, positivo; -, negativo; i, inconclusivo. *m*, fator de multiplicação para a avaliação de resultados significantemente negativos. Nível de significância  $\alpha = \beta = 0,05$ .

b. Incluindo manchas simples *ftr*<sup>3</sup> raras.

c. Considerando os clones *mwh* para as manchas simples *mwh* e para as manchas gêmeas.

Abreviaturas: CN, Controle negativo; MSP, Manchas simples pequenas; MSG, Manchas simples grandes; MG, Manchas gêmeas, quando possuir células *ftr*<sup>3</sup> e *mwh* simultaneamente; TM, Total de manchas; F, frequência de manchas mutantes.

**Tabela 2.** Frequências de manchas mutantes observadas em asas de descendentes trans-heterozigotos marcados (*mwh/flr<sup>3</sup>*) de *D. melanogaster* do cruzamento de alta biativação metabólica (HB) após tratamento crônico com extratos etanólicos de folhas de *O. lancifolia* (EEOL) e *O. minarum* (EEOM)

| Genótipos<br>Concentrações<br>( mg/mL )  | nº de<br>indivíduos<br>( N ) | Manchas por indivíduos (nº manchas) diagnóstico estatístico <sup>a</sup> |   |                                               |   |                    |   |                    |   |  |     | Total<br>manchas<br><i>mwh</i> <sup>c</sup><br>( n ) |
|------------------------------------------|------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|---|-----------------------------------------------|---|--------------------|---|--------------------|---|--|-----|------------------------------------------------------|
|                                          |                              | MSP<br>(1-2 céls) <sup>b</sup><br><i>m</i> = 2                           |   | MSG<br>(>2 céls) <sup>b</sup><br><i>m</i> = 5 |   | MG<br><i>m</i> = 5 |   | TM<br><i>m</i> = 2 |   |  |     |                                                      |
|                                          |                              |                                                                          |   |                                               |   |                    |   |                    |   |  |     |                                                      |
| <i>HB</i><br><i>mwh/flr</i> <sup>3</sup> |                              | <i>F</i>                                                                 | D | <i>F</i>                                      | D | <i>F</i>           | D | <i>F</i>           | D |  |     |                                                      |
| CN                                       | 40                           | 0,50 (20)                                                                |   | 0,00 (00)                                     |   | 0,00 (00)          |   | 0,50 (20)          |   |  | 20  |                                                      |
| DXR (0,125)                              | 40                           | 2,00 (80)                                                                | + | 3,15 (126)                                    | + | 3,95 (158)         | + | 9,10 (364)         | + |  | 355 |                                                      |
| EEOL (0,625)                             | 40                           | 0,37 (15)                                                                | - | 0,02 (01)                                     | - | 0,00 (00)          | - | 0,40 (16)          | - |  | 16  |                                                      |
| EEOL (1,25)                              | 40                           | 0,45 (18)                                                                | - | 0,02 (01)                                     | - | 0,05 (02)          | - | 0,52 (21)          | - |  | 21  |                                                      |
| EEOL (2,50)                              | 40                           | 0,42 (17)                                                                | - | 0,05 (02)                                     | - | 0,02 (01)          | - | 0,50 (20)          | - |  | 20  |                                                      |
| EEOM (0,625)                             | 40                           | 0,37 (15)                                                                | - | 0,05 (02)                                     | - | 0,02 (01)          | - | 0,45 (18)          | - |  | 18  |                                                      |
| EEOM (1,25)                              | 40                           | 0,35 (14)                                                                | - | 0,00 (00)                                     | - | 0,02 (01)          | - | 0,37 (15)          | - |  | 15  |                                                      |
| EEOM (2,50)                              | 40                           | 0,30 (12)                                                                | - | 0,02 (01)                                     | - | 0,00 (00)          | - | 0,32 (13)          | - |  | 13  |                                                      |

a. Diagnóstico estatístico de acordo com Frei & Würzler (1988): D, diagnóstico estatístico: +, positivo; -, negativo; i, inconclusivo. m, fator de multiplicação para a avaliação de resultados significativamente negativos. Nível de significância  $\alpha = \beta = 0,05$ .

b. Incluindo manchas simples *flr<sup>3</sup>* raras.

c. Considerando os clones *mwh* para as manchas simples *mwh* e para as manchas gêmeas.

Abreviaturas: CN, Controle negativo; MSP, Manchas simples pequenas; MSG, Manchas simples grandes; MG, Manchas gêmeas, quando possuir células *flr<sup>3</sup>* e *mwh* simultaneamente; TM, Total de manchas; F, frequência de manchas mutantes.

**Tabela 3.** Resultados obtidos no teste de mancha de asas de *D. melanogaster* de descendentes trans heterozigotos marcados (MH) e heterozigoto balanceado (BH) do cruzamento padrão (ST), após tratamento crônico com extrato etanólico de folhas da *O. acutifolia* (EEOA)

| Genótipos<br>Concentração<br>( mg/mL ) | nº de<br>indivíduos<br>( N ) | Manchas por indivíduos (nº manchas) diagnóstico estatístico <sup>a</sup> |   |                                               |   |                    |   |                    |   |     |     | Total<br>manchas<br><i>mwh</i> <sup>c</sup><br>observadas<br>( n ) | Total<br>manchas<br><i>mwh</i> <sup>c</sup><br>corrigidas | % de<br>Rec. |
|----------------------------------------|------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|---|-----------------------------------------------|---|--------------------|---|--------------------|---|-----|-----|--------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|--------------|
|                                        |                              | MSP<br>(1-2 céls) <sup>b</sup><br><i>m</i> = 2                           |   | MSG<br>(>2 céls) <sup>b</sup><br><i>m</i> = 5 |   | MG<br><i>m</i> = 5 |   | TM<br><i>m</i> = 2 |   |     |     |                                                                    |                                                           |              |
|                                        |                              |                                                                          |   |                                               |   |                    |   |                    |   |     |     |                                                                    |                                                           |              |
| ST<br><i>mwh/flr</i> <sup>3</sup>      |                              | <i>F</i>                                                                 | D | <i>F</i>                                      | D | <i>F</i>           | D | <i>F</i>           | D |     |     |                                                                    |                                                           |              |
| CN                                     | 40                           | 0,50 (20)                                                                |   | 0,05 (02)                                     |   | 0,02 (01)          |   | 0,57 (23)          |   | 23  |     |                                                                    |                                                           |              |
| DXR (0,125)                            | 40                           | 2,00 (80)                                                                | + | 2,62 (105)                                    | + | 3,40 (136)         | + | 8,02 (321)         | + | 309 | 286 | 89                                                                 |                                                           |              |
| EEOA (0,625)                           | 40                           | 0,45 (18)                                                                | i | 0,15 (06)                                     | i | 0,05 (02)          | i | 0,65 (26)          | - | 26  | 03  |                                                                    |                                                           |              |
| EEOA (1,25)                            | 40                           | 0,52 (21)                                                                | - | 0,27 (11)                                     | + | 0,12 (05)          | + | 0,92 (37)          | + | 37  | 14  | 100                                                                |                                                           |              |
| EEOA (2,50)                            | 40                           | 0,62 (28)                                                                | - | 0,17 (07)                                     | i | 0,17 (07)          | + | 1,05 (42)          | + | 42  | 17  | 100                                                                |                                                           |              |
| <i>mwh/TM3</i>                         |                              |                                                                          |   |                                               |   |                    |   |                    |   |     |     |                                                                    |                                                           |              |
| CN                                     | 40                           | 0,30 (12)                                                                |   | 0,00 (00)                                     |   |                    |   | 0,30 (12)          |   | 12  |     |                                                                    |                                                           |              |
| DXR (0,125)                            | 40                           | 0,95 (39)                                                                | + | 0,10 (04)                                     | i |                    |   | 1,07 (43)          | + | 43  | 31  |                                                                    |                                                           |              |
| EEOA (0,625)                           | 40                           | 0,25 (10)                                                                | - | 0,02 (01)                                     | - |                    |   | 0,27 (11)          | - | 11  | -1  |                                                                    |                                                           |              |
| EEOA (1,25)                            | 40                           | 0,17 (07)                                                                | - | 0,05 (02)                                     | - |                    |   | 0,22 (09)          | - | 09  | -3  |                                                                    |                                                           |              |
| EEOA (2,50)                            | 40                           | 0,25 (10)                                                                | - | 0,02 (01)                                     | - |                    |   | 0,27 (11)          | - | 11  | -1  |                                                                    |                                                           |              |

a. Diagnóstico estatístico de acordo com Frei & Würzler (1988): D, diagnóstico estatístico: +, positivo; -, negativo; i, inconclusivo. m, fator de multiplicação para a avaliação de resultados significativamente negativos. Nível de significância  $\alpha = \beta = 0,05$ .

b. Incluindo manchas simples *flr<sup>3</sup>* raras.

c. Considerando os clones *mwh* para as manchas simples *mwh* e para as manchas gêmeas.

Abreviaturas: CN, Controle negativo; MSP, Manchas simples pequenas; MSG, Manchas simples grandes; MG, Manchas gêmeas, quando possuir células *flr<sup>3</sup>* e *mwh* simultaneamente; TM, Total de manchas; F, frequência de manchas mutantes; Rec, Recombinação.

sentes nos extratos. Na maioria das vezes, o potencial mutagênico é mais evidente nas espécies vegetais em que os mutágenos estão presentes em maiores concentrações (Chung *et al.* 2006).

O estudo químico realizado com o EEOL forneceu, além de sesquiterpenos ácidos, principalmente flavonóides (Camargo *et al.* 2009). Na literatura são atribuídas atividades citotóxicas e apoptóticas em culturas de células para os sesquiterpenos (Hibasami *et al.* 2003, Park *et al.* 2002, Dirsch *et al.* 2001, Wen *et al.* 2002, Robles *et al.* 1995, Penissi *et al.* 1998), portanto, su-

gere-se que a ausência de efeito genotóxico pode ser atribuída a presença de substâncias de natureza ácida, bem como, à quantidade de flavonóides presente no extrato em maiores concentrações, tal como o flavonóide epicatequina.

De acordo com a literatura a epicatequina tem ação antitumoral (Choi *et al.* 2004), antimutagênica, antige-notóxica (Geetha *et al.* 2004) e antioxidante (Scott *et al.* 1993), outros flavonóides obtidos de *Maytenus ilicifolia* e *Peltatus peltastes* também foram responsáveis pelos resultados negativos para mutagenicidade e citotoxici-

**Tabela 4.** Resultados obtidos no teste de mancha de asas de *D. melanogaster* de descendentes trans heterozigotos marcados (MH) e heterozigoto balanceado (BH) do cruzamento de alta capacidade de bioativação metabólica (HB), após tratamento crônico com diferentes concentrações de extrato etanólico das folhas da *O. acutifolia* (EEOA).

| Genótipos<br>Concentrações<br>( mg/mL ) | nº de<br>indivíduos<br>( N ) | Manchas por indivíduos (nº manchas) diagnóstico estatístico <sup>a</sup> |   |                               |   |              |   |              |   | Total<br>manchas<br>mwh <sup>c</sup><br>observadas<br>( n ) | Total<br>manchas<br>mwh <sup>c</sup><br>corrigidas | % de<br>Rec. |
|-----------------------------------------|------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|---|-------------------------------|---|--------------|---|--------------|---|-------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------|--------------|
|                                         |                              | MSP<br>(1-2 céls) <sup>b</sup>                                           |   | MSG<br>(>2 céls) <sup>b</sup> |   | MG           |   | TM           |   |                                                             |                                                    |              |
|                                         |                              | <i>m</i> = 2                                                             |   | <i>m</i> = 5                  |   | <i>m</i> = 5 |   | <i>m</i> = 2 |   |                                                             |                                                    |              |
| HB<br><i>mwh/flr</i> <sup>3</sup>       |                              | <i>F</i>                                                                 | D | <i>F</i>                      | D | <i>F</i>     | D | <i>F</i>     | D |                                                             |                                                    |              |
| CN                                      | 40                           | 0,52 (21)                                                                |   | 0,07 (03)                     |   | 0,05 (02)    |   | 0,65 (26)    |   | 26                                                          |                                                    |              |
| DXR (0,125)                             | 40                           | 2,30 (92)                                                                | + | 5,05 (202)                    | + | 7,22 (289)   | + | 14,57 (583)  | + | 561                                                         | 535                                                | 89           |
| EEOA (0,625)                            | 40                           | 0,95 (38)                                                                | + | 0,10 (04)                     | i | 0,12 (05)    | i | 1,17 (47)    | + | 47                                                          | 21                                                 | 33           |
| EEOA (1,25)                             | 40                           | 0,72 (29)                                                                | i | 0,30 (12)                     | + | 0,20 (08)    | i | 1,22 (49)    | + | 49                                                          | 23                                                 | 35           |
| EEOA (2,50)                             | 40                           | 1,25 (50)                                                                | + | 0,17 (07)                     | i | 0,25 (10)    | + | 1,67 (67)    | + | 63                                                          | 37                                                 | 59           |
| <i>mwh/TM3</i>                          |                              |                                                                          |   |                               |   |              |   |              |   |                                                             |                                                    |              |
| CN                                      | 40                           | 0,32 (13)                                                                |   | 0,00 (00)                     |   |              |   | 0,32 (13)    |   | 13                                                          |                                                    |              |
| DXR (0,125)                             | 40                           | 1,50 (60)                                                                | + | 0,22 (09)                     | + |              |   | 1,07 (43)    | + | 69                                                          | 56                                                 |              |
| EEOA (0,625)                            | 40                           | 0,65 (26)                                                                | + | 0,02 (01)                     | - |              |   | 0,67 (27)    | + | 27                                                          | 14                                                 |              |
| EEOA (1,25)                             | 40                           | 0,57 (23)                                                                | i | 0,12 (05)                     | + |              |   | 0,70 (28)    | + | 28                                                          | 15                                                 |              |
| EEOA (2,50)                             | 40                           | 0,60 (24)                                                                | + | 0,10 (04)                     | i |              |   | 0,70 (28)    | + | 28                                                          | 15                                                 |              |

a. Diagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würzler (1988): D, diagnóstico estatístico: +, positivo; -, negativo; i, inconclusivo. m, fator de multiplicação para a avaliação de resultados significativamente negativos. Nível de significância  $\alpha = \beta = 0,05$ .

b. Incluindo manchas simples *flr*<sup>3</sup> raras.

c. Considerando os clones mwh para as manchas simples mwh e para as manchas gêmeas.

Abreviaturas: CN, Controle negativo; MSP, Manchas simples pequenas; MSG, Manchas simples grandes; MG, Manchas gêmeas, quando possuir células *flr*<sup>3</sup> e mwh simultaneamente; TM, Total de manchas; F, frequência de manchas mutantes; Rec, Recombinação.

dade nos testes de Salmonella/ microssoma (Camparoto *et al.* 2002, Horn & Vargas 2002).

A análise química realizada com o EEOM forneceu também compostos ácidos do tipo sesquiterpenos (Nogueira *et al.* 2007), sugerindo que a ausência de efeito genotóxico do EEOM observada pode ser atribuída a presença destes compostos no extrato, tal como o observado para o EEOL.

Uma vez comprovada a atividade genotóxica dos EEOA, foram analisados os indivíduos BH (mwh/TM3) do cruzamento ST, verificou-se que não apresentavam atividade mutagênica em nenhuma das concentrações avaliadas. Entretanto, quando foram comparadas as frequências de manchas observadas nos descendentes MH com as do BH os resultados apontaram para uma alta frequência de recombinação mitótica (Tab. 3), acima do observado para o controle positivo.

A análise dos indivíduos MH resultantes do cruzamento HB, tratados com diferentes concentrações de EEOA (Tab. 4) revelaram aumento nas frequências de manchas mutantes, diferente estatisticamente do observado no controle negativo, indicando atividade genotóxica. As frequências de manchas observadas para os indivíduos BH do cruzamento HB também foram maiores do que a observada no controle negativo, demonstrando atividade genotóxica. Estas informações indicam que o EEOA depois de metabolizado diminui a taxa de recombinação e aumenta a de mutação.

Portanto o EEOA avaliado com o SMART apresentou atividade genotóxica (mutagênica e recombinogênica) dose dependente em ambos os cruzamentos, demonstrando altas frequências de recombinação mitótica, aci-

ma do observado para o controle positivo (DXR), que induziu elevadas frequências de manchas mutantes, devido preponderantemente à recombinação mitótica, estando de acordo com os resultados encontrados em trabalhos anteriores (Valadares *et al.* 2008).

As atividades mutagênicas e recombinogênicas observadas nos grupos tratados com EEOA sugerem estar relacionadas aos alcalóides isolados desse extrato, particularmente, os alcalóides ocoteína, dicentrina e talicminina, presentes em alta concentração (Garcez *et al.* 2011).

Diversos alcalóides são reconhecidos por sua genotoxicidade (Mei *et al.* 2004, Mei *et al.* 2005, Ansah *et al.* 2005) e pelo potencial farmacológico proeminente, apresentando atividade antimicrobiana, antiplasmodial e antitumoral (Hoet *et al.* 2004, Stéveny *et al.* 2002). Para dicentrina há também o fato de que interfere com a atividade catalítica das topoisomerasas I e II (Hoet *et al.* 2004), ocasionando quebras na molécula do DNA. De acordo com Spencer *et al.* (2008), a recombinação homóloga é o principal mecanismo usado pelas células para reparar quebras de fita dupla de DNA.

Os resultados obtidos neste trabalho para o EEOA corroboram com os encontrados por Zhou *et al.* (2000), para extratos de *Ocotea leucoxydon*, que contém os alcalóides dicentrinona e dicentrina. Estes extratos mostraram atividade seletiva típica de inibidores da enzima topoisomerase I, em ensaios com levedura. Estudos bioquímicos com topoisomerase I recombinante revelaram que a dicentrinona e dicentrina são inibidores desta enzima.

Marques *et al.* (2003), relataram atividade mutagê-

nica para o extrato hidrometanólico de *Ocotea duckei*, rico em alcalóides, o qual induziu mutações *frameshift* e de substituições quando avaliado com o teste de Ames (Morais et al. 1998).

Em conclusão, o presente estudo indica que nas condições testadas os EEOL e EEOM não apresentam atividade genotóxica. Entretanto, o EEOA possui atividade mutagênica e recombinogênica no teste SMART. A diferença de atividade observada para os extratos etanólicos obtidos destas plantas pode estar relacionada à concentração e as diferentes classes de metabólitos secundários encontradas em cada extrato.

Os resultados obtidos neste estudo para o EEOA sugerem cuidados quanto ao uso indiscriminado de plantas medicinais pela população, sendo imprescindíveis estudos farmacológicos destas e outras espécies de plantas, a fim de caracterizar os possíveis efeitos adversos e esclarecer a população quanto à segurança do uso dessas plantas.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Universidade Estadual do Mato Grosso do Sul (UEMS) e às agências brasileiras de fomento à pesquisa CAPES, CNPq, FUNDECT e FAPEMIG.

## REFERÊNCIAS

- ANSAH, C., KHAN, A. & GOODERHAM, N. J. 2005. *In vitro* genotoxicity of the West African anti-malarial herbal *Cryptolepis sanguinolenta* and its major alkaloid cryptolepine. *Toxicology*, 208: 141-147.
- CAMARGO, M. J., GARCEZ, W. S. & GARCEZ, F. R. 2009. Biflavonoids, sesquiterpenes and other secondary metabolites from the leaves of *Ocotea lancifolia* (Lauraceae). In: 2nd Brazilian Conference on Natural Products. 2009, Águas de São Pedro, SP. Anais 2nd BCNP, 2009 CD, 2009. v. 1. p. PS053.
- CAMPAROTO, M. L., TEIXEIRA, R. O., MANTOVANI, M. S. & VICENTINI, V. E. P. 2002. Effects of *Maytenus ilicifolia* Mart. and *Bauhinia candicans* Benth infusions on onion root-tip and rat bone-marrow cells. *Genetics and Molecular Biology*, 25: 85-89.
- CHOI, Y. B., KIM, Y. I., LEE, K. S., KIM, B. S. & KIM, D. J. 2004. Protective effect of epigallocatechin gallate on brain damage after transient middle cerebral artery occlusion in rats. *Brain Research*, 1019: 47-54.
- CHUNG, Y. C., CHIEN, C. T., KAI, Y. T., SUTZE, C. Y. C., SHIN-CHIEN, C., KAI, Y. & SU-TZE, C. T. 2006. Antioxidative and mutagenic properties of *Zanthoxylum ailanthoides* Sieb & zucc. *Food Chemistry*, 97: 418-425.
- DIRSCH, V. M., STUPPNER, H. & VOLLMAR, A. M. 2001. Cytotoxic sesquiterpene lactones mediate their death-inducing effect in leukemia T cells by triggering apoptosis. *Planta Medica*, 67: 557-559.
- FOURNET, A., FERREIRA, M. H., ARIAS, A. R., GUY, I., GUINAUDEAU, H. & HEINZEN, H. 2007. Phytochemical and antiprotozoal activity of *Ocotea lancifolia*. *Fitoterapia*, 78: 382-384.
- FREI, H. & WÜRGLER, F. E. 1988. Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assay indicate a positive, negative, or inconclusive result. *Mutation Research*, 203: 297-308.
- FREI, H. & WÜRGLER, F. E. 1995. Optimal experimental design and sample size for the statistical evaluation of data from somatic mutation and recombination tests (SMART) in *Drosophila*. *Mutation Research*, 334: 247-258.
- FUNASAKI, M., LORDELLO, A. L. L., VIANA, A. M., SANTA-CATARINA, C., FLOH, E. I. S., YOSHIDA, M. & KATOI, M. J. 2009. Neolignans and sesquiterpenes from leaves and embryogenic cultures of *Ocotea Catharinensis* (Lauraceae). *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 20: 853-859.
- GARCEZ, F. R., SILVA, A. F. G., GARCEZ, W. S., LINCK, G., MATOS, M. C., SANTOS, E. C. & QUEIROZ, L. M. 2011. Cytotoxic aporphine alkaloids from *Ocotea acutifolia*. *Planta Medica*, 77: 383-387.
- GEETHA, T., GARG, A., CHOPRA, K. & KAUR, I. P. 2004. Delineation of antimutagenic activity of catechin, epicatechin and green tea extract. *Mutation Research*, 556: 65-67.
- GRAF, U. & VAN SCHAIK, N. 1992. Improved high bioactivation cross for the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research*, 271: 59-67.
- GRAF, U., WÜRGLER, F. E., KATZ, A. J., FREI, H., JUON, H., HALL, C. B. & KALE, P. G. 1984. Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environmental and Mutagenesis*, 6: 153-188.
- HIBASAMI, H., YAMADA, Y., MOTEKI, H., KATSUZAKI, H., IMAI, K. & YOSHIOKA, K. & KOMIYA, T. 2003. Sesquiterpenes (costunolide and zaluzanin D) isolated from laurel (*Laurus nobilis* L.) induce cell death and morphological change indicative of apoptotic chromatin condensation in leukemia HL-60 cells. *International Journal of Molecular Medicine*, 12: 147-151.
- HOET, S., STÉVIGNY, C., BLOCK, S., OPPERDOES, F., COLSON, P., BALDEYROU, B., LANSIAUX, A., BAILLY, C. & QUETIN-LECLERCQ, J. 2004. Alkaloids from *Cassytha filiformis* and related aporphines: antitrypanosomal activity, cytotoxicity, and interaction with DNA and topoisomerases. *Planta Medica*, 70: 407-413.
- HORN, R. C. & VARGAS, V. M. F. 2002. Antimutagenic activity of extracts of natural substances in the Salmonella/microsome assay. *Mutagenesis*, 18: 113-118.
- MARQUES, R. C. P., MEDEIROS, S. R. B., DIAS, C. S., BARBOSA-FILHO, J. M. & AGNES-LIMA, L. F. 2003. Evaluation of the mutagenic potential of yangambin and of the hydroalcoholic extract of *Ocotea duckei* by the Ames test. *Mutation Research*, 536: 117-120.
- MEI, N., GUO, L., FU, P. P., HEFLICH, R. H. & CHEN, T. 2005. Mutagenicity of comfrey (*Symphytum officinale*) in rat liver. *British Journal of Cancer*, 92: 873-875.
- MEI, N., HEFLICH, R. H., CHOU, M. W. & CHEN, T. 2004. Mutations induced by the carcinogenic pyrrolizidine alkaloid riddelliine in the liver cII gene of transgenic big blue rats. *Chemical Research in Toxicology*, 17: 814-818.
- MORAES, P. L. R. 2005. Sinopse das Lauráceas nos estados de Goiás e Tocantins, Brasil. *Biota Neotrópica*, 5: 1-18.
- MORAIS, L. C. S. L., BARBOSA-FILHO, J. M. & ALMEIDA, R. N. 1998. Central depressant effects of reticuline extracted from *Ocotea duckei* in rats and mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 62: 57-61.
- NOGUEIRA, C. R., GARCEZ, F. R., GARCEZ, W. S., HAMERSKI, L. & LUCINÉIA VIZZOTTO, L. Sesquiterpenos das folhas de *Ocotea minarum*. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 30., 2007, Águas de Lindóia, SP. CD-Rom, 2007.
- PARK, E. J. PEZZUTO, & J. M. 2002. Botanicals in cancer chemoprevention. *Cancer and Metastasis Reviews*, 21: 221-255.
- PENISSI, A. B., FOGAL, T., GUZMÁN, J. A. & PIEZZI, R. S. 1998. Gastrointestinal mucosal protection induced by dehydroleucodine. Mucus secretion and role of monoamines. *Digestive Diseases Sciences*, 43: 791-798.
- ROBLES, M., AREGULLIN, M., WEST, J. & RODRIGUEZ, E. 1995. Recent Studies on the Zoopharmacognosy, Pharmacology and Neurotoxicology of Sesquiterpene Lactones (A review). *Planta Medica*, 61: 99-103.
- SCOTT, B. C., BUTLER, J., HALLIWELL, B. & ARUOMA, O. I. 1993. Evaluation of the antioxidant actions of ferulic acid and catechins. *Free Radical Research Communications*, 19: 241-253.
- SCOTT, B. C., BUTLER, J., HALLIWELL, B. & ARUOMA, O. I. 1993. Evaluation of the antioxidant actions of ferulic acid and catechins. *Free Radical Research Communications*, 19: 241-253.

- SILVA, I. G., LACERDA, C. D. G., BARBOSA-FILHO, J. M., SILVA, M. S. & CUNHA, E. V. L. 2002. Coclaurine from *Ocotea duckei*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 30: 881-883.
- SINIGAGLIA, M., LEHMANN, M., BAUMGARDT, P., AMARAL, V. S., DIHL, R. R., REGULY, M. L. & ANDRADE, H. H. R. 2006. Vanillin as a modulator agent in SMART test: Inhibition in the steps that precede N-methyl-N-nitrosourea-, N-ethyl-N-nitrosourea-, ethylmethanesulphonate- and bleomycin-genotoxicity. *Mutation Research*, 607: 225-230.
- SPENCER, D. M. S., BILARDI, R. A., KOCH, T. H., POST, G. C., NAFIE, J. W., KIMURA, K. I., CUTTS, S. M. & PHILIPS, D. R. 2008. DNA repair in response to anthracycline-DNA adducts: a role for both homologous recombination and nucleotide excision repair. *Mutation Research*, 638: 110-121.
- STEVIGNY, C., BLOCK, S., PAUW-GILLET, M. C., HOFFMANN, E., LLABRES, G., ADJAKIDJE, V. & QUETIN-LECLEREQ, J. 2002. Cytotoxic aporphine alkaloids from *Cassytha filiformis*. *Planta Medica*, 68: 1042-1044.
- TOGNOLINI, M., BAROCELLI, E., BALLABENI, V., BRUNI, R., BIANCHI, A. & CHIAVARINI, M. 2006. Comparative screening of natural essential oils: phenylpropanoid moiety as basic core for antiplatelet activity. *Life Sciences*, 78: 1419-1432.
- VALADARES, B. L. B., GRAF, U. & SPANÓ, M. A. 2008. Inhibitory effects of water extract of propolis on doxorubicin-induced somatic mutation and recombination in *Drosophila melanogaster*. *Food Chemical Toxicology*, 46: 1103-1110.
- WEN, J., YOU, K. R., LEE, S. Y., SONG, C. H. & KIM D. G. 2002. Oxidative stress-mediated apoptosis: The anticancer effect of the sesquiterpene lactone parthenolide. *Journal Biological Chemistry*, 277: 38954.
- ZANIN, S. M. & LORDELLO, A. L. L. 2007. Alcalóides aporfinóides do gênero *Ocotea* (Lauraceae). *Química Nova*, 30: 92-98.
- ZHOU, B. N., JOHNSON, R. K., MATTERN, M. R., WANG, X., HECHT, S. M., BECK, H. T., ORTIZ, A. & KINGSTON, D. G. I. 2000. Isolation and Biochemical Characterization of a New Topoisomerase I Inhibitor from *Ocotea leucoxydon*. *Journal of Natural Product*, 63: 217-221.
- ZSCHOCKE, S., DREWES S. E., PAULUS, K., BAUER, R. & VAN STANDEN, J. 2000a. Analytical and pharmacological investigation of *Ocotea bullata* (black stinkwood) bark and leaves. *Journal of Ethnopharmacology*, 71: 219-230.
- ZSCHOCKE, S., VAN STANDEN, J., PAULUS, K., BAUER, R., HORN, M. M., MUNRO, N. J. & DREWES, S. 2000b. Stereostructure and anti-inflammatory activity of three diastereomers of ocbullenone from *Ocotea*. *Phytochemistry*, 54: 591-595.