

**LÍRIA GRANATO NUNES**

**PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA E AVALIAÇÃO DE MUTAGENICIDADE *IN VITRO*  
DE TRÊS ESPÉCIES VEGETAIS: *Strychnos pseudoquina* A. St.-Hil., *Coutarea*  
*hexandra* (Jacq.) K. Schum e *Bathysa cuspidata* (A.St.-Hil.) Hook**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola para obtenção do título de Magister Scientiae.

**VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2008**

LÍRIA GRANATO NUNES

**PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA E AVALIAÇÃO DE MUTAGENICIDADE *IN VITRO*  
DE TRÊS ESPÉCIES VEGETAIS: *Strychnos pseudoquina* A. St.-Hil., *Coutarea  
hexandra* (Jacq.) K. Schum e *Bathysa cuspidata* (A.St.-Hil.) Hook**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola para obtenção do título de Magister Scientiae.

**APROVADA: 17 de outubro de 2008**

---

Profa. Ana Maria Dantas Barros

---

Profa. Andréa de Oliveira Barros Ribon

---

Profa. Márcia Rogéria de Almeida Lamêgo  
**(Co-orientadora)**

---

Prof. Luciano Gomes Fietto  
**(Co-orientador)**

---

Prof. João Paulo Viana Leite  
**(Orientador)**

Agradeço, acima de tudo, **a Deus**, que me deu saúde, inteligência e muita perseverança para concluir mais essa etapa de minha vida.

Aos meus pais, Sebastião e Regina, a quem sempre serei grato por ter chegado até aqui. Nunca poderei retribuir à altura.

Ao meu namorado, Lincoln, que me apoiou em cada momento, agüentando meus desesperos, lamentações e, principalmente, estando sempre do meu lado e torcendo por mim.

As minhas irmãs, Karla e Thaísa, que sempre me deram força para continuar seguindo meu caminho e não deixando que desistisse jamais.

A todos os meus familiares que em todo momento sempre torceram para meu sucesso.

**Amo todos vocês!!!**

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Dr. João Paulo pelos ensinamentos, pela paciência e por sempre estar disposto a ouvir e eliminar as dúvidas de seus alunos.

Ao Prof. Dr. Luciano Gomes Fietto, por permitir a utilização de seu laboratório e me auxiliar em alguns experimentos.

A todos os alunos do laboratório que me auxiliaram nas horas que precisei, em especial ao Douglas.

Ao botânico André Furtado Carvalho pelo auxílio na coleta e identificação das espécies vegetais provenientes do bioma Cerrado.

Ao biólogo Victor Peçanha de Miranda Coelho, mestrando do Departamento de Botânica da UFV, pelo auxílio na coleta e identificação da espécie vegetal proveniente do bioma Mata Atlântica.

A profa. Eliana Varanda, pelo fornecimento das cepas e de ter lhe recebido em seu laboratório no Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, UNESP, Araraquara – SP.

Às pesquisadoras Maria Gorette R. Duarte e a Carolina Paula S. Moreira do laboratório de Bioprospecção Farmacêutica da FUNED, Belo Horizonte – MG, pela disponibilização da infra-estrutura e auxílio na obtenção dos cromatogramas por CLAE.

Ao prof. Paulo Roberto Cecon do Departamento de Estatística da UFV que auxiliou nas análises estatísticas.

Ao secretário Eduardo do Programa de Pós-graduação em Bioquímica Agrícola – UFV, que sempre tem nos auxiliado nos trâmites burocráticos.

À FAPEMIG pelo auxílio financeiro.

A todos aqueles que de alguma forma colaboraram com a concretização desse trabalho e cujos nomes não foram citados aqui. Nunca me esquecerei de vocês.

**Muito Obrigada!!!**

## **BIOGRAFIA**

Nascida em Rio Pomba, Minas Gerais, em dezoito de setembro de 1982, filha de Sebastião Nunes de Paula e Regina Célia Granato Nunes.

Graduada em Bioquímica pela Universidade Federal de Viçosa em março de 2007. Durante sua graduação foi estagiária no Laboratório de Purificação e Expressão de Proteínas, do Depto de Bioquímica e Biologia Molecular, desenvolvendo pesquisa na área de purificação de peptídeos de soja germinada, no Laboratório de Fisiologia Molecular, do Depto de Biologia Vegetal, desenvolvendo pesquisa na área de proteômica do café e em análise molecular de um tipo de arroz transgênico.

Em agosto de 2007, ingressou no curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola, defendendo a dissertação em 17 de outubro de 2008, intitulada mestre.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>ix</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>xi</b>
<b>LISTA DE SIGLAS.....</b>	<b>xii</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>xiii</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>xv</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>4</b>
2.1 Importância do estudo das plantas medicinais.....	4
2.2 Drogas de origem vegetal.....	5
2.3 Metabolismo secundário vegetal.....	8
2.3.1 Terpenos .....	9
2.3.2 Polifenóis.....	11
2.3.3 Alcalóides .....	13
2.4 Mutagenicidade em plantas medicinais.....	14
2.4.1 Testes para avaliação de mutagenicidade.....	16
2.4.1.1 O teste de SMART ( <i>Somatic mutation and recombination test</i> )....	17
2.4.1.2 Teste de troca de cromátides irmãs.....	18
2.4.1.3 Teste de mutagênese e recombinação em <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	19
2.4.1.4 Teste de micronúcleos.....	20
2.4.1.5 Teste de aberrações cromossômicas.....	21
2.4.1.6 Teste cometa.....	21
2.4.1.7 Teste de Ames – ensaio de mutação gênica reversa em <i>Salmonella typhimurium</i> (teste <i>Salmonella</i> ) microsoma.....	22
2.5 Metabólitos secundários e mutagenicidade.....	24
2.6 Espécies vegetais popularmente conhecidas como quina.....	26
2.6.1 <i>Strychnos pseudoquina</i> St. Hil. (Loganiaceae) .....	28

2.6.2 <i>Coutarea hexandra</i> (Jacq.) K. Schum (Rubiaceae) .....	30
2.6.3 <i>Bathysa cuspidata</i> (A.St.-Hil.) Hook.f. (Rubiaceae).....	32
2.7. Alcalóides quinina e estricnina .....	33
<b>3. METODOLOGIA .....</b>	<b>36</b>
3.1 Materiais, métodos e equipamentos.....	36
3.2 Coleta e identificação do material vegetal.....	37
3.3 Obtenção do extrato vegetal.....	37
3.4 Prospecção fitoquímica.....	38
3.5 Obtenção dos perfis cromatográficos por CLAE dos extratos vegetais .....	40
3.6 Quantificação de polifenóis totais, proantocianidinas e flavonóides nos extratos vegetais.....	41
3.6.1 Polifenóis totais e proantocianidinas.....	41
3.6.1.1 Obtenção do extrato para quantificação de polifenóis totais e proantocianidinas.....	41
3.6.1.2 Quantificação de polifenóis totais.....	42
3.6.1.3 Quantificação de proantocianidinas.....	43
3.6.2 Flavonóides.....	44
3.6.2.1 Obtenção do extrato flavônico.....	45
3.7. Teste de <i>Ames</i> .....	46
3.7.1 Linhagens utilizadas.....	46
3.7.2 Preparo dos inóculos de <i>S. typhimurium</i> utilizados no ensaio.....	47
3.7.3 Meios de cultura.....	47
3.7.4 Controles.....	48
3.7.5 Ensaio de mutagenicidade.....	48
3.7.6 Análise Estatística dos Resultados.....	48
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....</b>	<b>50</b>
4.1 Rendimento dos extratos etanólicos secos .....	50
4.2 Prospecção fitoquímica .....	50
4.3 Perfis Cromatográficos (CLAE) .....	54

4.4	Quantificação de polifenóis totais, proantocianidinas e flavonóides nos extratos vegetais .....	58
4.4.1	Polifenóis totais .....	58
4.4.2	Proantocianidinas .....	61
4.4.3	Flavonóides .....	63
4.5	Mutagenicidade .....	66
4.5.1	Avaliação da atividade mutagênica de folhas e cascas de <i>C. hexandra</i> .....	66
4.5.2	Avaliação da atividade mutagênica de folhas e cascas de <i>S. pseudoquina</i> .....	68
4.5.3	Avaliação da atividade mutagênica de folhas e cascas de <i>B. cuspidata</i> .....	70
4.5.4	Avaliação da atividade mutagênica dos alcalóides quinina e estricnina..	71
4.5.5	Resultados de mutagenicidade e metabolismo secundário .....	73
<b>5.</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>77</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>79</b>

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Plantas popularmente conhecidas como “quina” usadas como antimalárica.....	27
Tabela 2 - Correlação sistemática das espécies <i>Strychnos pseudoquina</i> , <i>Coutarea hexandra</i> e <i>Bathysa cuspidata</i> .....	28
Tabela 3 - Prospecção fitoquímica dos extratos etanólicos de folhas e cascas das espécies vegetais <i>Coutarea hexandra</i> , <i>Strychnos pseudoquina</i> e <i>Bathysa cuspidata</i> .....	39
Tabela 4 – Gradiente de eluição empregado na análise por CLAE-FR com detecção em UV 220nm.....	40
Tabela 5 – Gradiente de eluição empregado na análise por CLAE-FR com detecção em UV em 254nm.....	41
Tabela 6 - Concentrações de pirogalol utilizadas na construção da curva de calibração de polifenóis totais.....	42
Tabela 7 – Concentrações de catequinas utilizadas na construção da curva de calibração de proantocianidinas.....	44
Tabela 8 - Concentrações de rutina utilizadas na construção da curva de calibração de proantocianidinas.....	45
Tabela 9 – Rendimento de resíduos secos dos extratos etanólicos das cascas e folhas das espécies vegetais <i>Coutarea hexandra</i> , <i>Strychnos pseudoquina</i> e <i>Bathysa cuspidata</i> .....	50
Tabela 10 - Resultados da prospecção fitoquímica dos extratos etanólicos de cascas e folhas de <i>Coutarea hexandra</i> , <i>Strychnos pseudoquina</i> e <i>Bathysa cuspidata</i> .....	51
Tabela 11 - Teor médio de polifenóis totais das folhas e cascas das espécies <i>Coutarea hexandra</i> , <i>Strychnos pseudoquina</i> e <i>Bathysa cuspidata</i> .....	60
Tabela 12 - Teor de proantocianidinas de cascas e folhas das espécies <i>Coutarea hexandra</i> , <i>Strychnos pseudoquina</i> e <i>Bathysa cuspidata</i> .....	62
Tabela 13 - Teor de flavonóides totais nas cascas e folhas das espécies <i>Coutarea hexandra</i> , <i>Strychnos pseudoquina</i> e <i>Bathysa cuspidata</i> .....	65

Tabela 14 - Resultado da atividade mutagênica dos extratos etanólicos de folhas e cascas de <i>Coutarea hexandra</i> .....	67
Tabela 15 - Resultado da atividade mutagênica dos extratos etanólico de folhas e cascas de <i>Strychnos pseudoquina</i> .....	69
Tabela 16 - Resultado da atividade mutagênica do extrato etanólico da casca de <i>Strychnos pseudoquina</i> .....	70
Tabela 17 - Resultado da atividade mutagênica dos extratos etanólico de folhas e cascas de <i>Bathysa cuspidata</i> .....	71
Tabela 18 - Resultados da atividade mutagênica dos alcalóides quinina e estricnina.....	72
Tabela 19 - Resultados da atividade mutagênica dos alcalóides quinina e estricnina.....	72

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - <i>Strychnos pseudoquina</i> St. Hil.....	29
Figura 2 - <i>Coutarea hexandra</i> (Jacq.) K. Schum.....	31
Figura 3 - <i>Bathysa cuspidata</i> (A.St.-Hil.) Hook.....	33
Figura 4 – Estruturas dos alcalóides quinidina e quinina.....	34
Figura 5 - Estrutura do alcalóide estricnina .....	35
Figura 6 - Esquema do cromatograma obtido da cromatofolha de sílica gel GF <sub>254</sub> revelada com reagente de Drangendorff.....	53
Figura 7 - Cromatogramas de RP-HPLC de extratos etanólicos das espécies vegetais <i>Bathysa cuspidata</i> , <i>Coutarea hexandra</i> e <i>Strychnos pseudoquina</i> condição 1.....	55
Figura 8 - Cromatogramas de RP-HPLC de extratos etanólicos das espécies vegetais <i>Bathysa cuspidata</i> , <i>Coutarea hexandra</i> e <i>Strychnos pseudoquina</i> condição 2.....	56
Figura 9 - Curva de calibração para o pirogalol.....	59
Figura 10 – Curva de calibração para a catequina.....	62
Figura 11 – Curva de calibração para a rutina.....	64

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS e SÍMBOLOS

µg: micrograma

AMG: Agar mínimo glicosado

ANOVA: Análise de variância

BCC: extrato de cascas de *Bathysa cuspidata*

BCF: extrato de folhas de *Bathysa cuspidata*

CCD: Cromatografia em camada delgada

CHC: extrato de cascas de *Coutarea hexandra*

CHF: extrato de folhas de *Coutarea hexandra*

CLAE: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CLAE-FR: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa

Ctrol -: Controle negativo

Ctrol +: Controle positivo

DMSO: Dimetilsufóxido

DNA: Ácido desoxirribonucléico

ETOH: Etanol

mg: miligrama

OMS: Organização Mundial da Saúde

RM: Razão de mutagenicidade

RNA: Ácido ribonucléico

-S9: Sem ativação metabólica

SPC: extrato de cascas de *Strychnos pseudoquina*

SPF: extrato de folhas de *Strychnos pseudoquina*

UV: Ultra-violeta

λ: comprimento de onda

## RESUMO

NUNES, Líria Granato, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, outubro de 2008. **Prospecção fitoquímica e avaliação de mutagenicidade *in vitro* de três espécies vegetais: *Strychnos Pseudoquina* A. St.-Hil., *Coutarea Hexandra* (Jacq.) K. Schum e *Bathysa Cuspidata* (A.St.-Hil.) Hook.** Orientador: João Paulo Viana Leite. Co-orientadores: Luciano Gomes Fietto e Márcia Rogéria de Almeida Lamêgo.

O Brasil tem a flora mais diversa do mundo quanto a plantas terrestres, com cerca de 45.000 espécies de plantas superiores, que equivale a quase 22% de todas as espécies vegetais conhecidas do planeta. Nesse grande patrimônio, vale ressaltar a importância da diversidade química dos metabólitos secundários biossintetizados pelas plantas, a qual tem despertado grande interesse da indústria farmacêutica visando a descoberta de novos fármacos. Nesse cenário, a fitoterapia tem ressurgido como opção medicamentosa bem aceita e acessível em diferentes países, entre esses o Brasil. No entanto, grande parte das plantas medicinais da flora nativa brasileira consumida na medicina popular apresenta poucas informações sobre suas propriedades química, farmacológica e toxicológica. No emprego de plantas medicinais, faz-se importante a prevenção de possíveis riscos mutagênicos relacionados a compostos presentes nos vegetais, para minimizar a sua exposição ao homem. Nesse contexto, insere-se o presente trabalho, que visou o estudo de cascas e folhas de três espécies nativas do Brasil, conhecidas popularmente como quina e usadas na medicina tradicional, a saber: *Strychnos pseudoquina* A. St.-Hil., família Loganiaceae; *Coutarea hexandra* (Jacq.) K. Schum e *Bathysa cuspidata* (A.St.-Hil.) Hook., ambas da família Rubiaceae. Esse estudo realizou a prospecção fitoquímica por Cromatografia em Camada Delgada (CCD) de sílica gel e por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), como também, a análise quantitativa de grupos de metabólitos secundários potencialmente ativos, de forma a comparar a composição química entre as espécies, e também auxiliar na identificação das respectivas drogas vegetais. Outro aspecto avaliado foi a ação mutagênica dos extratos utilizando Teste de Ames – ensaio de mutação gênica reversa em *Salmonella typhimurium*.

Por se tratarem de espécies vegetais pertencentes a gêneros botânicos reconhecidamente portadores de alcalóides ativos, a presença dos produtos naturais quinina e estricnina, obtidos de amostras comerciais, foi investigada nos extratos, sendo também avaliados quanto ao potencial mutagênico. Os resultados obtidos pela prospecção fitoquímica mostraram certa semelhança entre os grupos de metabólitos secundários encontrados nas espécies avaliadas. Entre as cascas e folhas das três espécies vegetais foram detectadas diferenças na composição química. Pela quantificação de polifenóis totais, proantocianidinas e flavonóides pode-se verificar variação no conteúdo químico dos mesmos, nas diferentes espécies. A espécie *B. cuspidata* e *C. hexandra* não apresentaram potencial de mutagenicidade para as folhas e cascas frente às cepas TA 100 e TA 98. Já para a espécie *S. pseudoquina*, as cascas do caule não mostraram ação mutagênica, enquanto os extratos das folhas apresentaram potencial mutagênico para as linhagens TA100 e TA98 nas doses utilizadas. Não foi evidenciada, por CCD, a presença dos alcalóides quinina e estricnina nos extratos. Padrões destes alcalóides não apresentaram potencial mutagênico, mas citotoxicidade em doses elevadas. Contudo, como no uso popular dessas três espécies, as cascas constituem a parte mais empregada, a ausência de mutagenicidade demonstrada pelo teste de Ames para esse farmacógeno é um subsídio para o estabelecimento da segurança dessas drogas vegetais. O uso de folhas de *S. pseudoquina* requer cautela, devendo ser proscrito e estudos mais aprofundados serão necessários para avaliar esse potencial mutagênico.

## ABSTRACT

NUNES, Líria Granato, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, October 2008. **Phytochemistry prospection and mutagenicity evaluate *in vitro* of tree species vegetable: *Strychnos Pseudoquina* A. St.-Hil., *Coutarea Hexandra* (Jacq.) K. Schum and *Bathysa Cuspidata* (A.St.-Hil.) Hook.** Adviser: João Paulo Viana Leite. Co-Advisers: Luciano Gomes Fietto and Márcia Rogéria de Almeida Lamêgo.

Brazil has the most diversified flora in the world concerning terrestrial plants, with about 45,000 species of superior plants, which correspond to almost 22% of all known vegetable species of the planet. In that great patrimony is worth emphasizing the importance of the chemical diversity of the biosynthetic secondary metabolites of these plants, which have recently arisen great interest of the pharmaceutical industry hoping to discover life-saving property drugs as well as new raw materials for the industry in general. In that scenery, the phytotherapy has revived as a therapeutic option well accepted and accessible in different countries, including Brazil. However, the vast majority of Brazilian medicinal plants heritage along with its usage, chemical, toxicological, pharmacological properties lack of appropriate assessment. It is important to fully investigate them all in order to prevent any possible mutagenic and/or other risks related to it. In that context, the present work aims at the study of barks and leaves of three native species of the popularly known as "quina" which is used in traditional medicine: *Strychnos pseudoquina* A. St.-Hil., Loganiaceae family; *Coutarea hexandra* (Jacq.) K. Schum and *Bathysa cuspidata* (A.St.-Hil.) Hook., both of the Rubiaceae family. That study carried out phytochemistry prospection through Thin Layer Chromatography (TLC) of gel silica and through High-performance Liquid Chromatography (HPLC), as well as the quantitative analysis of groups of potentially active secondary metabolites, so as to compare the chemical composition among the species, and also aid in the identification of the respective vegetable drugs. Another appraised aspect was the mutagenic action of the extracts using Ames Test – assay of reverse genic mutation in *Salmonella typhimurium*. Once the investigated vegetable species belong to botanical genus that are bearers of active alkaloids, the presence of the

natural occurring products quinine and strychnine, obtained from commercial samples, was investigated in the extracts, being appraised also as to the mutagenic potential. The results obtained by the phytochemistry prospection showed certain similarity among the groups of secondary metabolites found in the appraised species. Among barks and leaves of the three vegetable species differences were detected in the chemical composition. By the quantification of total polyphenolics, proanthocyanidins and flavonoids variation can be verified in the chemical content of them in the different species. The species *B. cuspidata* and *C. hexandra* did not present mutagenic potential in leaves and barks when confronted with TA 100 and TA 98 strains. For the species *S. pseudoquina*, barks of the stem did not show mutagenic action while the extracts of leaves presented mutagenic potential for TA100 and TA98 strains in the used doses. There was no evidence of the presence of the alkaloids quinine and strychnine in the extracts through TLC. Standards of these alkaloids did not present mutagenic potential but cytotoxicity in high doses. Due to the fact that the popular use of these three species the bark constitutes the most employed part, the mutagenicity absence demonstrated by the Ames test for that pharmacogene is a subsidy for the establishment of the safety of these vegetable drugs. The use of leaves of *S. pseudoquina* requests caution and should be banned since further studies will be necessary to evaluate that mutagenic potential.

## 1. INTRODUÇÃO

O Brasil tem a flora mais diversa do mundo quanto a plantas terrestres, quase 22% da flora mundial (Lewinsohn; Prado, 2002). Nesse grande patrimônio, vale ressaltar a importância da diversidade química dos produtos naturais biossintetizados pelas plantas para a descoberta de novos fármacos, a qual tem despertado interesse da indústria farmacêutica. Atualmente, produtos naturais lideram as estruturas químicas inovadoras com atividade biológica, representando uma importante fonte para novos medicamentos. Pesquisas recentes estimam que cerca de 60% das drogas antitumorais e anti-infecciosas que estão no mercado, ou em fase de testes clínicos, são derivadas de produtos naturais (Motomiya et al., 2004).

O tratamento das enfermidades humanas a partir de plantas medicinais, ou seus derivados, é uma prática antiga e, atualmente, encontra-se em expansão por todo o mundo. A fitoterapia tem ressurgido como uma opção medicamentosa bem aceita e acessível em diferentes países, e, no caso do Brasil, é adequada para as necessidades locais de centenas de municípios brasileiros no atendimento primário à saúde (Eldin; Dunford, 2001).

Como consequência da grande difusão e utilização das plantas medicinais, as indústrias farmacêuticas vêm desenvolvendo produtos à base de extratos vegetais padronizados, principalmente fitoterápicos, que têm sido registrados para diferentes especialidades médicas (Melo et al., 2007).

Contudo, ainda não há garantia para a grande maioria das plantas medicinais, de sua eficácia, segurança e qualidade. Segundo Farias (2001), a eficácia de um medicamento é dada pela comprovação, por meio de ensaios farmacológicos pré-clínicos e clínicos, dos efeitos biológicos preconizados para esses recursos terapêuticos, e a segurança é determinada pelos ensaios que comprovam a ausência de efeitos tóxicos.

Existe um número cada vez maior de estudos científicos que comprovam a toxicidade de plantas, inclusive daquelas usadas na medicina popular, que são comumente consumidas sem restrição e de forma indiscriminada. Importante

ressaltar, o surgimento do conceito de “natural” associado aos produtos fitoterápicos, que contribuiu para o aumento do uso das plantas medicinais nas últimas décadas. Para muitas pessoas, esse conceito inspira a “ausência de componentes químicos nocivos à saúde”, levando a acreditar, portanto, que tais produtos não causam danos ou, de outra forma, não representam perigo para os usuários (Mengue et al., 2001). No entanto, a falsa propaganda veiculada na mídia e o desconhecimento por parte da população sobre possíveis efeitos secundários e toxicidade de espécies vegetais utilizadas habitualmente podem levar a sérias conseqüências para saúde (Moll, 2000).

Outro grave problema no uso de plantas medicinais, está associado ao nome popular dessas, que com bastante freqüência é atribuído o mesmo nome vulgar a diferentes espécies vegetais, como ocorre com a “quina”. No Brasil várias espécies de plantas são popularmente conhecidas como quina, apesar da Farmacopéia Brasileira (3ª edição) apresentar como espécie oficial para esse nome popular somente a espécie amazônica *Cinchona officinalis* Wedd. (Rubiaceae), bastante utilizada pela população desse bioma como antimalárica (Bertani et al., 2005). Importantes fármacos desenvolvidos para o tratamento da malária e usados até os dias atuais são derivados do alcalóide quinina e artemisinina, cujas descobertas foram inicialmente decorrentes de pesquisas etnofarmacológicas realizadas com povos tradicionais (Farnsworth, 1994; Mueller et al., 2005). A quinina tem sido usada no tratamento da malária humana há 350 anos (Meshnick, 1997; Meshnick, Dobson, 2001). No Brasil, várias plantas medicinais com atividade antimalárica promissora, entre essas a *Artemisia anua*, biossintetizadora do alcalóide artemisinina e de seus derivados, tem sido domesticadas e seus extratos testados em ensaios *in vitro* e *in vivo* (Carvalho et al., 1991; Krettli et al., 2001).

Buscando contribuir para o conhecimento de espécies vegetais nativas brasileiras, popularmente conhecidas na medicina popular como quina, a saber: *Strychnos pseudoquina* A. St.-Hil. da família Loganiaceae; *Coutarea hexandra* (Jacq.) K. Schum e *Bathysa cuspidata* (A.St.-Hil.) Hook., ambas da família Rubiaceae, o presente trabalho teve como objetivos:

- Realizar a prospecção fitoquímica de cascas do caule e de folhas das três espécies vegetais, com o intuito de comparar a composição química entre as espécies e entre os dois diferentes farmacógenos, folhas e cascas, bem como, para contribuir na identificação química dessas espécies;
- Obtenção dos perfis cromatográficos dos extratos por CLAE-FR para a análise química comparativa entre esses;
- Desenvolver metodologia de quantificação de polifenóis totais, proantocianidinas e flavonóides totais para os extratos, empregando técnica espectrofotométrica;
- Realizar e comparar o efeito mutagênico pelo teste de Ames sem ativação metabólica, empregando cepas TA100 e TA98 de *Salmonella typhimurium* para os extratos.
- Realizar e comparar o efeito mutagênico pelo teste de Ames sem ativação metabólica, empregando cepas TA100 e TA98 de *Salmonella typhimurium* para os alcalóides quinina e estricnina.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Importância do estudo das plantas medicinais

Desde os tempos remotos, a humanidade utiliza as plantas com finalidade terapêutica. De acordo com estudos com fósseis humanos, a utilização de plantas medicinais data há cerca de 60.000 anos (Fabricant; Farnsworth, 2001). Enquanto buscava alimentação para a sua sobrevivência, a humanidade foi descobrindo as propriedades tóxicas ou curativas das plantas. Assim, as plantas formam uma parte importante de nossa dieta, e seus constituintes e valores nutricionais têm sido intensamente estudados por décadas. Ainda hoje, a utilização de plantas com finalidade medicinal é bastante comum em todo planeta, sendo realizada, principalmente através de preparações caseiras (Santos et al., 2006a).

Esse conhecimento popular a respeito das plantas medicinais, acumulado ao longo de nossa evolução, culminou com o desenvolvimento de fármacos de grande importância na terapêutica atual, tais como o ácido salicílico, a atropina, a pilocarpina, a quinina, a artemisinina, o taxol, a digoxina e a morfina (Alves, 2001).

A partir das publicações científicas, intensificada principalmente a partir da década de 1980, sobre o potencial de tais investigações para descoberta de novos fármacos, a pesquisa envolvendo os saberes e práticas “tradicionais” ganharam novo sentido, extrapolando a simples compilação de plantas usadas na medicina popular. No Brasil, várias pesquisas foram realizadas com contribuições relevantes sobre o assunto, não somente quanto a aspectos fitoquímicos, mas também quanto à atividade biológica de extratos provenientes de plantas que ocorrem nos diferentes biomas brasileiros (Desmarchelier et al., 1999; Duarte et al., 2004; Jorge et al., 2004; Hiruma-Lima et al., 2006; Lima et al., 2006).

Muitas áreas da ciência estão envolvidas na pesquisa das plantas medicinais, como a Etnobotânica, que buscam informações a partir do conhecimento de diferentes povos e etnias; a Química de produtos naturais, que trabalha no isolamento, purificação e caracterização de princípios ativos; a

Bioquímica, Farmacologia e Toxicologia, que estudam os efeitos farmacológicos e toxicológicos de extratos e de constituintes químicos isolados; a Farmácia, envolvendo a transformação farmacotécnica dos extratos vegetais em formas farmacêuticas de características mais apropriadas para o paciente (Maciel et al., 2002; Mendonça-Filho; Menezes, 2003; Vendruscolo et al., 2005); entre outras.

As investigações etnobotânicas e etnofarmacológicas têm se mostrado eficiente como estratégia de seleção de plantas medicinais para a busca de novos fármacos. Por definição, a etnobotânica se ocupa da “inter-relação direta entre pessoas e plantas”, incluindo todas as formas de percepção e apropriação dos recursos vegetais (Albuquerque, 2005); e a etnofarmacologia se ocupa do estudo dos preparados tradicionais utilizados em sistemas de saúde e doença que incluem isoladamente ou em conjunto plantas, animais, fungos ou minerais. Na avaliação da eficácia dos usos “tradicionais” faz-se o emprego de um grande número de técnicas analíticas e de ensaios farmacológicos (Waller, 1993).

Assim, o estudo etnofarmacológico representa importante instrumento para a realização de pesquisa de bioprospecção, que aliado aos avanços da ciência, constituem importante caminho para a descoberta de novos fármacos; aproveitamento racional e preservação da biodiversidade; e promoção do uso local das plantas medicinais; devendo tais práticas científicas respeitar legislações pertinentes, como propriedade intelectual do conhecimento tradicional associado e acesso ao patrimônio genético (Etkin, 2001).

Nesse contexto, estabelece-se um ambiente profícuo e produtivo para a pesquisa científica, sobretudo a brasileira, envolvendo a aplicação de conhecimentos locais sobre o uso de plantas medicinais. Aquele saber popular antes subestimado pelo paradigma científico, passou a ser instrumento de cooperação de saberes (Leite, 2008a).

## **2.2 Busca de novos fármacos de origem vegetal**

Embora a medicina moderna esteja bem desenvolvida na maior parte do mundo, a Organização Mundial da Saúde (OMS) reconhece que grande parte da

população dos países, sobretudo em desenvolvimento, depende da medicina tradicional para sua atenção primária. Cerca de 80% da população mundial utilizam práticas tradicionais nos seus cuidados básicos de saúde, sendo que 85% dessa utiliza-se plantas ou suas preparações (Farnsworth et al., 1985; Kaur et al., 2005). Assim, o estímulo em relação ao estudo de plantas medicinais e de seus extratos vem crescendo na assistência à saúde em função de sua fácil aceitabilidade, disponibilidade e menor custo para a pesquisa e desenvolvimento de fármacos. Já é reconhecida a importância dos produtos naturais, incluindo aqueles derivados de plantas, no desenvolvimento de modernas drogas terapêuticas (Calixto, 1997).

Em 1978, a Assembléia Geral da Organização Mundial de Saúde (OMS) deu início a um programa em que se dava ênfase ao uso de plantas medicinais, cujo principal objetivo era alcançar a meta “Saúde para todos no ano 2000”. Nas décadas que se seguiram, o uso de plantas medicinais pela população mundial tem sido bastante significativo, mesmo nos países industrializados. Os recursos vegetais representam alvo estratégico para a pesquisa farmacológica e o desenvolvimento de novas drogas, tanto para a produção de fitoterápicos, como também para a obtenção de metabólitos purificados (fitofármacos) que são usados diretamente como agentes terapêuticos; e para uso como protótipo para a síntese de fármacos, servindo como modelo estrutural de compostos farmacologicamente ativos (WHO, 1978).

Estima-se que aproximadamente 40% dos medicamentos atualmente disponíveis foram desenvolvidos direta ou indiretamente a partir de fontes naturais (Calixto et al., 2001). Das 252 drogas consideradas básicas e essenciais pela Organização Mundial de Saúde, 11% são originárias de plantas e um número significativo são drogas sintéticas obtidas a partir de protótipos e precursores naturais (Rates, 2001).

Nos anos 80, o desenvolvimento da pesquisa científica resultou na identificação de 121 compostos de origem vegetal, provenientes de 95 espécies de plantas. Grande parte desses estão incluídos no atual arsenal terapêutico dos países ocidentais. No período 1983-1994, 6% dos medicamentos aprovados foram

extraídos diretamente de espécies vegetais; outros 24% foram de produtos derivados e 9% foram desenvolvidos através de modelagem molecular, onde as estruturas moleculares dos compostos serviram como precursores de processos de sínteses químicas. Atualmente, metade dos 25 medicamentos mais vendidos no mundo tem sua origem em metabólitos secundários vegetais, também conhecidos como produtos naturais (Alves, 2001). Assim, os metabólitos secundários despertam grande interesse pela potencialidade de efeitos farmacológicos.

Contudo, devido à necessidade da descoberta de novas drogas, vários estudos de caracterização biológica e pesquisa sobre os efeitos colaterais têm sido intensificados com princípios ativos isolados de plantas (Elbling et al., 2005; Mei et al., 2005). No Brasil, que possui cerca de 60.000 espécies vegetais superiores catalogadas, estima-se que somente 8% dessas espécies foram estudadas quanto a sua química, e estima-se que apenas 1.100 espécies tenham sido avaliadas quanto às suas propriedades terapêuticas (Guerra et al., 2001). Essas pesquisas encontram-se muito centradas no âmbito de Universidades e Institutos de Pesquisa. Muito embora já existam vários grupos nacionais envolvidos com a busca de princípios bioativos de plantas e algumas parcerias empresas-universidades tenham surgido com a introdução de novos fitoterápicos no mercado, essa pesquisa é fundamentalmente acadêmica (Montanari; Bolzani, 2001).

Levando-se em consideração que o Brasil é um país de megabiodiversidade e de grande sócio-diversidade ética e cultural, detentor de valioso conhecimento tradicional associado ao uso de plantas medicinais, o país se credencia como ambiente potencial para a pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos, refletindo no aumento da competitividade do seu complexo produtivo na área de Saúde.

## 2.3 Metabolismo secundário vegetal

Uma das características dos seres vivos é a presença de atividade metabólica. O metabolismo consiste no conjunto de reações químicas que ocorre no interior das células, podendo ser dividido nos vegetais em metabolismos primário e secundário.

Entende-se por metabolismo primário o conjunto de processos metabólicos que desempenham uma função essencial no vegetal, tais como a fotossíntese, a respiração e o transporte de solutos. Os compostos envolvidos no metabolismo primário possuem uma distribuição universal nas plantas. Esse é o caso dos aminoácidos, dos nucleotídeos, dos lipídios e carboidratos.

Em contrapartida, o metabolismo secundário origina compostos que não possuem uma distribuição universal, pois não são necessários para todas as plantas. Como consequência prática, esses compostos podem ser utilizados em estudos de quimiosistemática, como também, na química de produtos naturais bioativos (Leite, 2008b).

Os metabólitos secundários produzidos pelos vegetais são formados por várias rotas biossintéticas que produzem moléculas dotadas de grande diversidade de esqueletos estruturais, originando classes de compostos como, hidrocarbonetos terpênicos, flavonóides, cumarinas, quinonas, taninos, saponinas, alcalóides e outros (Alves, 2001).

Anteriormente, os metabólitos secundários eram vistos como produtos sem função fisiológica, sendo resultado do catabolismo do metabolismo primário, possuindo pequena importância no metabolismo e crescimento da planta (Richard et al., 1994). No entanto, essa visão mudou radicalmente após a investigação mais aprofundada desses metabólitos, o que possibilitou a descoberta de funções relacionadas ao desenvolvimento fisiológico das plantas e seu papel como mediadores das interações entre as plantas e outros organismos (Simões et al., 2002). O principal papel biológico dos metabólitos secundários na planta está relacionado a proteção contra ataque de insetos, herbívoros e patógenos ou outros estresses bióticos e abióticos (Jian et al., 2005). Atualmente, os metabólitos

secundários são considerados notáveis recursos de matéria-prima para as indústrias de medicamento, cosmético, alimento e agroquímica.

A produção desses compostos no vegetal depende diretamente do estágio fisiológico e de desenvolvimento da planta, bem como fatores edafoclimáticos, como solo, temperatura, luminosidade e outros (Dixon, 2001; Oksman; Inze, 2004).

Na classificação de metabólitos secundários, três grandes classes podem ser destacadas: compostos terpênicos, fenólicos e alcaloídicos. Esses compostos são biossintetizados por diferentes vias metabólicas que utilizam como precursores metabólitos: ácido mevalônico, 3-fosfoglicerato e aminoácidos.

### **2.3.1 Terpenos**

Os terpenos representam uma ampla e importante classe de produtos naturais com mais de 30.000 estruturas diferentes, consistindo polímeros de isopreno (C<sub>5</sub>) (Mattijs et al., 2006).

Os terpenos são biossintetizados pela justaposição sucessiva de unidades isoprênicas de cinco carbonos denominadas isopentenilpirofosfato (IPP) e seu isômero. O IPP é derivado do ácido mevalônico ou mevalonato e dá origem a todos os outros terpenos. Contudo, é necessário salientar que enquanto os monoterpenos (C<sub>10</sub>), sesquiterpenos (C<sub>15</sub>) e diterpenos (C<sub>20</sub>) são biossintetizados pela adição de unidades isoprênicas, sucessivamente; os triterpenos (C<sub>30</sub>) são o resultado da junção de duas moléculas C<sub>15</sub> (FPP - pirofosfato de farnesila) e os tetraterpenos de duas moléculas C<sub>20</sub> (GGPP - pirofosfato de geranylgeranila) (Peres, 2004).

Os monoterpenos e sesquiterpenos, de baixos pesos moleculares, são compostos voláteis, sendo, constituintes de óleos essenciais ou essências. Contudo, existem componentes de óleos essenciais que são compostos fenólicos (fenilpropanóides). Esses compostos voláteis podem ser estocados nos vegetais em pêlos glandulares (Lamiaceae), células parenquimáticas diferenciadas (Lauraceae, Piperaceae, Poaceae); canais oleíferos (Apiaceae) ou em bolsas

lisígenas ou esquizolisígenas (Pinaceae, Rutaceae). Eles podem estar estocados em flores (laranjeira), folhas (capim-limão, eucalipto, louro) ou em cascas de caules (canelas), cerne (sândalo, pau-rosa) e frutos (erva-doce) (Peres, 2004).

A função dos óleos essenciais nas plantas pode ser tanto para atrair polinizadores (principalmente os noturnos), quanto para repelir insetos, podendo atuar como mecanismo de defesa contra pragas e doenças. Alguns sesquiterpenos são considerados fitoalexinas, como o metabólito rishitina de tomateiro (Peres, 2004). Na fitoterapia, os óleos essenciais também são responsáveis por importantes atividades farmacológicas como bactericida, antiinflamatória, sedativa e outras (Duarte et al., 2007).

Os diterpenos normalmente estão associados às resinas de muitas plantas. Alguns desses compostos desempenham importante papel funcional na planta como hormônios vegetais, participando da germinação de sementes, alongamento caulinar e expansão dos frutos de muitas espécies vegetais, como no caso das giberelinas.

Outros metabólitos secundários terpênicos, como os triterpenos e esteróides, também são de grande interesse na pesquisa de plantas medicinais, apresentando várias ações funcionais para o vegetal e farmacológica para o ser humano (Peres, 2004). Dentro desse grupo de triterpenos e esteróides, a sua diferenciação estrutural pode dar origem a outras importantes classes de metabólitos secundários, como as saponinas e heterosídeos cardiotônicos (Leite, 2008b).

As saponinas são estruturalmente bastante diversas, compreendendo dois grandes grupos, os glicosídeos triterpênicos e os glicosídeos esteroidais, consistindo, assim, de uma aglicona apolar acoplada com uma ou mais unidade de monossacarídeos. Suas propriedades anfílica e tensoativa distinguem esses compostos de alguns outros glicosídeos naturais. O termo saponina deriva da palavra latina *sapo*, que significa “sabão”, devido ao fato desses produtos naturais formarem espuma abundante quando em solução aquosa (Vincken et al., 2007).

Os glicosídeos cardiotônicos são chamados desta forma devido à sua ação sobre o músculo cardíaco. Estes compostos agem sobre a fisiopatologia da

insuficiência cardíaca, caracterizada pelo infarto do miocárdio com edema e congestão periférica. Esses metabólitos são capazes de aumentar a contratilidade do miocárdio exercendo efeito inotrópico positivo. Infelizmente, o uso dos glicosídeos cardiotônicos tem sido restrito, em função de seus efeitos pró-arritmogênicos e do reduzido índice terapêutico que possuem (Simões et al., 2003).

### **2.3.2 Polifenóis**

Os compostos fenólicos apresentam importante função nos vegetais de proteção contra raios UV, insetos, fungos, vírus e bactérias. Há inclusive certas espécies vegetais que biossintetizam compostos fenólicos para inibir o crescimento de outras plantas competidoras (ação alelopática). Esses compostos são sintetizados a partir de duas rotas metabólicas principais: as vias do ácido chiquímico e do acetato-malonato (Peres, 2004).

A via do ácido chiquímico é presente em plantas, fungos e bactérias, mas não em animais. Importantes enzimas dessas vias são o 5-enolpiruvil-3-fosfochiquimato sintase (EPSP sintase) e a fenilalanina amônio liase (PAL). Essa última catalisa a reação de retirada do grupamento amônia do aminoácido fenilalanina, formando o ácido cinâmico. A PAL é regulada por fatores ambientais como o nível nutricional, a luz (pelo efeito do fitocromo) e infecção por fungos. Entre os metabólitos formados após a ação da PAL, está o ácido benzóico, o qual dá origem ao ácido salicílico, um importante composto na defesa das plantas contra patógenos (Peres, 2004).

A combinação de diferentes rotas metabólicas constitui também um importante caminho para a biossíntese de metabólitos secundários, proporcionando maior variedade estrutural de produtos naturais. A combinação das rotas Chiquimato e Acetato são responsáveis pela biossíntese de produtos naturais como flavonóides e taninos condensados.

Os flavonóides consistem em importante classe de metabólitos polifenólicos, presentes com relativa abundância e freqüência em vegetal.

Apresentam grande variação estrutural, possuindo no esqueleto básico 15 átomos de carbono, dispostos em esqueleto carbônico do tipo C6-C3-C6, na maioria das vezes em três anéis, denominados A, B e C.

Os flavonóides resultam da condensação de uma unidade 4-hidroxicinamoil-CoA, originada da rota Chiquimato, com três moléculas de malonil-CoA, integrante da rota Acetato, formando assim, o esqueleto C6-C3-C6. Sob ação da enzima chalcona sintase, o acoplamento dessas quatro moléculas promove a formação de uma chalcona, que está em equilíbrio com a forma cíclica de uma flavanona. Por sua vez, as chalconas atuam como precursoras de vasto número de sub-classes flavonoídicas no reino vegetal.

Mais de 4.000 flavonóides já foram identificados, estando, de acordo com as características estruturais, classificados dentro das subclasses flavanonas, flavonas, flavonóis, flavanonóis, leucoantocianidinas, catequinas, antocianidinas, isoflavonas e biflavonóides. (Leite, 2008b)

Entre os efeitos terapêuticos exercidos por alguns flavonóides ressaltam-se as atividades antioxidante, tônico vascular, antimicrobiana, antiinflamatória, antiulcerogênica e outras (Filho et al., 2001).

Os flavanóis são precursores de outro importante grupo de metabólitos secundários conhecidos como proantocianidinas, também chamados de taninos condensados. Os taninos apresentam como particularidade elevada massa molecular (entre 500 e 3.000 daltons) e capacidade de formar complexos, insolúveis em água, com proteínas e alcalóides. Taninos funcionam como defesa contra insetos herbívoros, pois eles se ligam a proteínas digestivas dos insetos (Peres, 2004). Os taninos vegetais são comumente divididos em duas subclasses: (a) taninos hidrolisáveis, que podem ser descritos como ésteres de ácido gálico com um poliol (tipicamente-*D*-glicose); e (b) proantocianidinas, que, como anteriormente citado, são de origem flavonoídica, estando sua denominação associada ao fato de produzirem pigmentos avermelhados (antocianidinas), após degradação (Peres, 2004). Aos extratos vegetais ricos em taninos são atribuídas atividades como antiinflamatória, cicatrizante, anti-hipertensiva, antiulcerogênica, antioxidante e outras (Leite, 2008b).

As cumarinas, outro grupo de metabólitos secundários fenólicos, são lactonas derivadas do ácido *orto*-hidroxicinâmico, estando presentes em diferentes partes das plantas. Várias drogas vegetais contendo cumarinas, especialmente furanocumarinas, são utilizadas no tratamento de doenças da pele, como psoríase, dermatoses, vitiligo e outras (Leite, 2008b). É importante ressaltar que alguns compostos cumarínicos possuem efeito anticoagulante, podendo ter interação com outros medicamentos (Alonso, 1998).

### **2.3.3 Alcalóides**

Atualmente, os alcalóides são definidos como produtos naturais nitrogenados de origem não-peptídica, tendo aminoácidos como precursores biossintéticos. São abundantes em vegetais superiores, insetos, anfíbios e fungos, sendo menos comuns em mamíferos. Um ou mais átomos de nitrogênio estão presentes nas moléculas alcaloídicas, geralmente na forma de aminas primárias, secundárias ou terciárias, conferindo basicidade ao alcalóide. A presença de nitrogênio quaternário é mais restrita, mas representada por importantes produtos naturais (Leite, 2008b).

Os alcalóides são sintetizados no retículo endoplasmático, concentrando-se, em seguida, nos vacúolos e, dessa forma, não aparecem em células jovens. Essa classe de compostos do metabolismo secundário é famosa pela presença de substâncias que possuem acentuado efeito no sistema nervoso, sendo muitas delas largamente utilizadas como venenos ou alucinógenos (Peres, 2004).

Relativamente poucos são os aminoácidos envolvidos como precursores biossintéticos de alcalóides, destacando-se principalmente: ornitina, lisina, histidina, tirosina, fenilalanina, triptofano, ácido antranílico e ácido nicotínico. Desses aminoácidos, apenas os ácidos antranílico e nicotínico não são  $\alpha$ -aminoácidos, ou seja, não apresentam ambos os grupos carboxila e amino ligados ao mesmo átomo de carbono (carbono  $\alpha$ ).

Dessa forma, os alcalóides podem ser classificados de acordo com o aminoácido precursor. Na estrutura química dos alcalóides são mantidos os

átomos de nitrogênio e, freqüentemente, o esqueleto carbônico do respectivo aminoácido, havendo, no entanto, eliminação do grupo carboxila por reações de descarboxilação. Já em um grande grupo de alcalóides, o(s) átomo(s) de nitrogênio é (são) incorporado(s) via reações de transaminação. Nesses casos, somente o nitrogênio da estrutura do aminoácido é adicionado à estrutura do alcalóide, enquanto o restante da molécula deriva de precursores originários de outras vias, como aquelas formadoras de terpenos ou esteróides. O termo pseudoalcalóides é utilizado para distinguir esse grupo (Leite, 2008b).

Em plantas, os alcalóides podem ocorrer na forma livre, como sais ou N-óxido. Esses compostos podem acumular em vacúolos como reserva ou frequentemente acoplado a ácidos fenólicos como ácido clorogênico ou ácido cafêico. Alcalóides podem ser classificados em termos de suas atividades biológicas, estrutura química ou mais aceito de acordo com a via biossintética (Mattijs et al., 2006).

Vários compostos alcaloídicos apresentam estreito índice terapêutico, alertando assim, para o uso daquelas espécies vegetais que os contêm, já que podem conferir toxicidade à planta. Esse fato faz com que vários alcalóides sejam preferencialmente utilizados na forma purificada (fitofármaco), como nos casos da morfina, atropina, vincristina e vimblastina, em preferência ao uso de extratos nos quais os alcalóides podem ser encontrados em ampla faixa de variação quantitativa (Leite, 2008b).

## **2.4 Mutagenicidade em plantas medicinais**

Os organismos vivos estão freqüentemente expostos a agentes ambientais que podem induzir modificações químicas tanto ao nível celular quanto molecular. Essas lesões podem ser induzidas por agentes químicos, físicos ou biológicos que são prejudiciais às células, uma vez que afetam processos vitais como a duplicação e a transcrição gênica. As alterações podem também causar mutações e aberrações cromossômicas, fenômeno esse que podem levar a processos cancerosos e morte celular. Pelo fato de causarem lesões no material genético e

potencialmente gerarem tumores em seres humanos, esses agentes são normalmente conhecidos como genotóxicos (Costa; Menk, 2000).

Danos ao DNA por mutágenos ambientais podem ser uma das causas de inaptidão em diferentes organismos, incluindo o homem (Cariño-Cortés et al., 2007). O acúmulo de mutações está relacionado com muitos cânceres e várias desordens degenerativas, como envelhecimento e defeitos genéticos (Cuzzocrea et al., 2001; Migliore; Coppedè, 2002). No campo da fitoterapia, faz-se importante a prevenção dos possíveis riscos genotóxicos relacionados a compostos mutagênicos presentes em plantas, para minimizar a sua exposição aos humanos (Edenharder et al., 2002). Segundo Nunes e Araújo (2003), apesar da utilização de plantas na medicina popular ser uma prática realizada há séculos para a cura de doenças, seus efeitos fisiológicos, genotóxicos e mutagênicos no organismo humano ainda carecem de maiores investigações.

Os estudos de genotoxicidade com plantas têm crescido juntamente com o aumento do uso terapêutico e com o interesse de comprovação da segurança dessas plantas nas mais diversas finalidades farmacológicas. Isso se deve ao fato de muitas das plantas utilizadas por um grande número de pessoas, apesar de possuírem propriedades farmacológicas, também podem causar alterações no DNA. Os riscos são ainda maiores quando o uso de chás e outras preparações fitoterápicas ocorrem de forma não controlada, sem a devida atenção quanto à identificação correta da planta, à parte do vegetal a ser utilizada e a forma de preparo e administração (Varanda, 2006). São muitas as plantas de uso popular que apresentam efeitos genotóxicos e o uso destas deveria ser feito com mais critério (Moreira et al., 2002).

É bem documentado que mutações gênicas atuam em etapas do processo de carcinogênese e que ensaios que detectam componentes genotóxicos permitem identificar substâncias com risco potencial aos seres humanos. Substâncias genotóxicas apresentam propriedades químicas e físicas que permitem suas interações com os ácidos nucleicos. Devido à sua alta reatividade, podem levar a defeitos hereditários através de mutações em células germinativas, e quando a mutação ocorre em células somáticas, a consequência mais comum é

a formação de tumores benignos ou malignos. Além disso, recentemente, foi proposto que as mutações em células somáticas podem também estar envolvidas na patogênese de algumas doenças crônicas degenerativas, tais como as cardiovasculares e neurodegenerativas, em adição ao processo de carcinogênese (De Flora et al., 1996; Andreassi et al., 2000; Aruoma, 2003; Ross; Margolis, 2005).

No desenvolvimento de um novo fármaco, os resultados de testes de genotoxicidade representam considerável importância, pois, a legislação prevê que para as indústrias farmacêuticas obterem o registro de um novo medicamento, é obrigada a apresentação de requisitos de segurança, envolvendo entre outros resultados de ensaios toxicológicos, aqueles referentes à genotoxicidade *in vitro* e *in vivo* (Purves et al., 1995). O desenvolvimento dos testes de citotoxicidade *in vitro* e seu reconhecimento pelos órgãos internacionais como *Food and Drug Administration*, em 1993, e *Organization for Economic Cooperation and Development*, em 1987, têm favorecido a substituição dos ensaios que utilizam animais em laboratórios (Hugget et al., 1996).

Contudo, apesar de registrar um crescimento da prática fitoterápica nas últimas décadas no Brasil, existe pouca informação quanto ao potencial de risco de várias plantas medicinais, sobretudo daquelas nativas, à saúde humana. Nesse contexto, os ensaios para avaliação da atividade mutagênica das plantas usadas pela população são necessários e importantes para estabelecer medidas de controle.

#### **2.4.1 Testes para avaliação de mutagenicidade**

A citotoxicidade e a genotoxicidade de extratos vegetais podem ser avaliadas por uma gama de bioensaios que possuem sensibilidade variada, expressando assim, resultados satisfatórios conforme o agente a que são expostos (Silva et al., 2003).

O emprego desses ensaios biológicos para o monitoramento da bioatividade de extratos, frações e produtos naturais isolados, tem sido

freqüentemente incorporado à identificação e monitoramento de agentes potencialmente tóxicos (Noldin et al., 2003). De acordo com Silva et al. (2003), a maioria dos bioensaios busca agentes que possam afetar em níveis fisiológico e molecular do organismo exposto; caso o agente cause danos ao DNA, esse passa a apresentar potencial genotóxico em qualquer tipo de célula (animal, vegetal ou microbianas), considerando a universalidade do código genético. Ainda segundo o mesmo autor, vários modelos foram propostos por diversos pesquisadores, órgãos de pesquisa e agências governamentais, e a seleção de testes a serem incluídos no modelo é de fundamental importância para o sucesso do mesmo, pois, neste contexto, cada vez mais são necessários novos ensaios para serem enquadrados nas estratégias de avaliação de risco que atendam às necessidades da vida contemporânea.

A Sociedade Brasileira de Mutagênese, Carcinogênese e Teratogênese Ambiental (SBMCTA) estabelece orientações que norteiam a realização adequada e a harmonização dos testes de mutagenicidade para a detecção de produtos que possam causar danos à saúde humana, sejam químicos, naturais, sintéticos, fitoterápicos, amostras ambientais ou quaisquer outros (SBMCTA, 2004).

#### *2.4.1.1 O teste de SMART (Somatic mutation and recombination test)*

Desenvolvido por Becker (1986) e aprimorado por Vogel (1987), o presente teste detecta a perda de heterozigiosidade de genes marcadores que determinam fenótipos identificados nas asas de *Drosophila melanogaster*. É um método que emprega células somáticas e pode ser realizado em apenas uma geração, aproximadamente em 10 dias.

O teste de “Mancha da asa” (SMART) baseia-se em grupos de células, discos imaginais, que proliferam separadamente durante o desenvolvimento até diferenciarem-se, durante a metamorfose, em estruturas do corpo da mosca adulta (olhos, asas, etc.). Uma vantagem da técnica está no fato de possibilitar a investigação de um amplo espectro de agentes genotóxicos de diferentes classes químicas, misturas complexas e também partículas gasosas (Silva et al., 2003).

Outra vantagem refere-se a possibilidade de exposição de uma grande população de células dividindo-se mitoticamente no disco imaginal da larva.

Dessa maneira, se uma alteração genética ocorre em uma célula do disco imaginal, essa poderá ser representada em todas as células descendentes e formar um clone de células mutantes, que pode ser detectado como uma mancha na superfície do corpo da mosca (Frei; Würigler, 1995).

#### 2.4.1.2 Teste de troca de cromátides irmãs

Durante a divisão celular, segmentos de DNA resultantes da replicação trocam de lugar, simetricamente. A esses eventos de translocação recíproca, que ocorrem no mesmo loco, entre as cromátides irmãs de um cromossomo, são denominadas SCEs (Sister Chromatid Exchange). A análise de frequência de trocas entre cromátides-irmãs é uma metodologia citogenética bastante sensível em estudos genotóxicos. Esse processo de permuta é considerado indicador da ocorrência de possíveis lesões e reparação da molécula de DNA em células de mamíferos, pois quanto mais o número de permutas aumenta, também aumenta o número de possibilidade de erros nas reuniões das cadeias de DNA.

A proporção entre a indução de SCE e de mutação ou aberração cromossômica é diferente para cada agente químico testado. Os agentes testados mostram diferentes eficiências de indução e cada tipo de lesão formada parece ser processado diferentemente pela célula, resultando em um tipo específico de dano. A correlação com outros tipos de danos no DNA cromossômico é bastante elevada, havendo, no entanto, substâncias ou processos onde esta correlação não foi detectada.

A indução de SCEs pode ser feita tanto *in vitro* como *in vivo* em quaisquer organismos onde seja possível fazer cultura de células. No cultivo celular, adicionam-se os marcadores que irão corar as cromátides-irmãs diferentemente, evidenciando as trocas quando ocorrem. Os ensaios de SCEs são muito sensíveis, mas trabalhosos; contudo, não podem ser considerados testes de

mutagênese, mas apenas indicativo, pois as trocas de cromátides-irmãs não resultam necessariamente em mutação (Silva et al., 2003).

#### 2.4.1.3 Teste de mutagênese e recombinogênese em *Saccharomyces cerevisiae*

Esse teste tem por objetivo avaliar agentes químicos e sua atividade mutagênica, utilizando como modelo o fungo unicelular *Saccharomyces cerevisiae*, que apresenta um ciclo eucariótico típico e completo. Os efeitos genéticos de mutagênicos podem ser avaliados em culturas haplóides e diplóides e em todos os estágios do ciclo celular como G1, síntese de DNA, mitose e meiose, assim como os elementos genéticos extranucleares, como as mitocôndrias. A recombinação mitótica em células diplóides pode ser reflexo da expressão das atividades de reparação celular em resposta aos danos introduzidos no genoma pelos agentes químicos. Substâncias que produzem mutações freqüentemente podem introduzir efeitos recombinantes (Silva et al., 2003).

O ensaio de conversão gênica mitótica na levedura mede a conversão de alelos inativos diferenciais para cada alelo do tipo selvagem pela ação de agentes mutagênicos. A linhagem da levedura diplóide heterozigota tem dois alelos inativos diferentes no mesmo locus gênico. A presença desses alelos causa uma dependência nutricional, isto é, essas células crescem somente em meio suplementado com nutriente específico. Quando ocorre a conversão do gene, um fenótipo do tipo selvagem muito ativo é produzido a partir desses alelos inativos através da recombinação intragênica. Para avaliar a indução de permutação mitótica, as linhagens de leveduras diplóides heterozigotas apresentam um par de marcadores recessivos, distantes entre si, mas localizados no mesmo braço cromossômico em diferentes homólogos e frente aos alelos selvagens correspondentes. O *crossing-over* resulta no posicionamento de ambos os alelos recessivos no mesmo cromossomo homólogo, enquanto que os alelos selvagens localizam-se no outro cromossomo homólogo (Henriques et al., 1987).

A levedura possui também um sistema endógeno de ativação metabólica, constituída pelo complexo enzimático citocromo P-450, o qual a torna capaz de

ativarem vários pré-mutagênicos sem necessidade de ativação de um sistema exógeno (Silva et al., 2003).

#### 2.4.1.4 Teste de micronúcleos

Micronúcleos (MN) são pequenos corpúsculos constituídos de material cromossômico. Após a separação das cromátides no processo mitótico, dois núcleos são reconstituídos, um em cada pólo. A membrana nuclear é refeita ao redor desses dois conjuntos cromossômicos, mas caso algum cromossomo inteiro ou fragmento cromossômico acêntrico não se integre ao novo núcleo (por não ser unido ao fuso), esse também pode ser considerado um micronúcleo.

Os micronúcleos então são, estruturalmente, pequenos núcleos representados por material genético que foi perdido pelo núcleo principal como consequência de um dano genético. Esse dano pode ser causado por agentes químicos, físicos ou biológicos, capazes de interferir no processo de ligação do cromossomo às fibras do fuso, ou que possam introduzir a perda de material genético (cromossomos inteiros ou fragmentos). O teste de micronúcleo, portanto, detecta mutagênese cromossômica em eucariotos do tipo clastogênese e danos ao fuso mitótico (Silva et al., 2003).

O teste de MN em organismo sob exposição aguda, menos de quatro semanas, é realizado em eritrócitos jovens, denominados policromatófitos (EPC) que por conterem RNA ribossomal se cora de forma diferenciada. Enquanto que na exposição crônica, os MN são avaliados tanto em EPC, como em eritrócitos maduros (ENC).

A análise por ser muito simples apresenta vantagem em relação à análise dos cromossomos. Os micronúcleos podem ser identificados em qualquer tipo de célula. Podem-se avaliar micronúcleos para diagnóstico de doenças hematológicas em células epiteliais da mucosa bucal, do trato urinário, e também monitorar ambientes através de teste em roedores, plantas e peixes (Silva et al., 2003). Em relação aos testes *in vivo*, os produtos a serem testados devem ser diluídos, preferencialmente, em água, pois é um solvente não tóxico.

#### 2.4.1.5 Teste de aberrações cromossômicas

A análise de aberrações cromossômicas é um teste de mutagenicidade para a detecção de compostos que causem alterações estruturais no DNA. É um dos poucos métodos diretos para mensurar mutações em sistemas expostos a mutagênicos ou carcinogênicos potenciais. Para avaliar os efeitos danosos que os mutagênicos podem causar, faz-se necessário que a amostra esteja em constante divisão mitótica, pois dessa forma é possível analisar as etapas da divisão celular, com o objetivo de identificar os efeitos tóxicos e alterações cromossômicas ao longo do processo de divisão celular. Esse teste é realizado em células meristemáticas de *Allium cepa* (cebola), *Vicia faba* (tipo de feijão pertencente à família [Fabaceae](#)) e *Tradescantia* spp. (gênero pertencente à [família Commelinaceae](#)), espécies desse gênero também são usadas no auxílio do controle da qualidade do ar, sendo empregadas no biomonitoramento da poluição ambiental, sendo, para isso, analisadas mutações ocorridas nas plantas. Tem sido amplamente empregado na análise rotineira para avaliação do potencial mutagênico de amostras ambientais (Silva et al., 2003).

#### 2.4.1.6 Teste cometa

O teste cometa ou SCGE (*Single Cell Gel Electrophoresis Assay*) é um teste de genotoxicidade capaz de detectar danos ao DNA induzidos por agentes alquilantes, intercalantes e oxidantes. Esse pode ser realizado tanto em animais como em vegetais, demonstrando a grande sensibilidade e rapidez dos resultados em estudos de genotoxicidade (Silva et al., 2003).

A metodologia do teste consiste, inicialmente, na disposição de uma suspensão de células submetidas em gel de agarose sobre a superfície de uma lâmina. Em seguida, as lâminas são transferidas para uma solução com alta concentração de sais e detergentes afim de lisar as células, removendo o seu conteúdo citoplasmático e membrana nuclear. Posteriormente, as lâminas são imersas em um tampão de pH variável de acordo com a versão do teste

empregado: versão neutra, que detecta quebras duplas nas moléculas de DNA, e versão alcalina, que detecta quebras de fita única e dupla. Tal processo visa o desenovelamento das cadeias de DNA, pelo rompimento de estruturas secundárias e terciárias presente no núcleo. Imediatamente ao processo de desenovelamento, as lâminas são submetidas a uma corrente elétrica de modo a induzir a migração dos fragmentos de DNA no sentido da corrente elétrica (Ribeiro et al., 2003).

O teste cometa é simples e rápido, pode ser executado em qualquer eucarioto, mas como qualquer teste, possui as suas limitações. Não é um teste de mutagênese, pois o dano pode ser reparado; por ser muito sensível deve-se ter cautela, além de um bom controle para análise das conclusões; e o tempo decorrido entre a exposição ao mutagênico e a preparação das lâminas, até a lise, deve ser curto, em média 24 horas, pois o reparo começa imediatamente (Silva et al., 2003).

#### 2.4.1.7 Teste de Ames – ensaio de mutação gênica reversa em *Salmonella typhimurium* – teste *Salmonella* – microssoma

O teste de Ames foi desenvolvido por Bruce Ames e colaboradores na Universidade da Califórnia, [Berkeley](#), na década de 70 e tem sido utilizado, mundialmente, nas últimas décadas para avaliar a mutagenicidade de substâncias químicas puras e misturas complexas (Henriques et al., 1987; Rolla, 1995). É um teste que tem sido amplamente empregado para identificar mutágenos entre metabólitos secundários isolados de plantas, como também, para extratos vegetais.

A maioria das linhagens bacterianas utilizada no teste apresenta características que as tornam mais sensíveis para detecção de mutações, incluindo seqüências sítio-específicas no DNA que respondem positivamente para reversão, aumento da permeabilidade celular a grandes moléculas, ausência do sistema de reparo de DNA livre de erro e plasmídios contendo genes que causam aumento do processo de reparo sujeito a erro. A especificidade das linhagens

fornece informações sobre os tipos de mutações que são induzidas por agentes genotóxicos. Existem bancos de dados disponíveis contendo resultados do teste com *Salmonella* para uma grande variedade de compostos químicos, medicamentos e misturas complexas (Griffiths et al., 2002).

Este teste de mutação gênica utiliza células procariotas, as quais diferem das células de mamíferos em fatores como permeabilidade, metabolismo, estrutura dos cromossomos e processo de reparo do DNA. Os testes são realizados *in vitro*, acrescidos de uma fonte exógena de metabolização visando mimetizar parcialmente as condições de metabolização de mamíferos. O teste não fornece informação direta sobre o potencial mutagênico em mamíferos, apesar da alta concordância dos resultados com o teste de Ames e ensaios de carcinogenicidade em roedores (Rabelo-Gay et al., 1991).

O teste emprega linhagens de *Salmonella typhimurium* derivadas da parental LT2, auxotróficas para histidina (his-), apresentando diferentes mutações no *operon* desse aminoácido. Tais linhagens são construídas para detectar mutações do tipo deslocamento do quadro de leitura ou substituição de pares de bases no DNA. Essas linhagens não são capazes de crescer em meio de cultura mínimo, sem histidina, a menos que ocorram mutações que restaurem sua capacidade de síntese. Suspensões de células bacterianas são expostas à amostra-teste, na presença e na ausência de um sistema de ativação metabólica exógeno, e plaqueadas em meio de cultura mínimo. O número de revertentes é facilmente medido pela contagem de colônias que crescem nesse meio de cultura após a exposição de uma população de bactérias à amostra a ser testada (Henriques et al., 1987).

Várias substâncias mutagênicas, primeiramente identificadas pelo teste de Ames, mostraram-se carcinogênicas em ensaios com animais (Maron; Ames, 1983).

## 2.5 Metabólitos secundários e Mutagenicidade

Devido à necessidade da descoberta de novas drogas, várias pesquisas de investigação de ações farmacológicas e toxicológicas têm sido intensificadas com extratos e princípios ativos isolados de plantas (Elbling et al., 2005; Mei et al., 2005; Rietjens et al., 2005). No entanto, vários desses extratos vegetais ainda não foram avaliados quanto a propriedades tóxicas, carcinogênicas e mutagênicas (Ames, 1983; Konstantopoulou et al., 1992; Tavares, 1996). Relatos da literatura científica têm demonstrado propriedades mutagênicas de vários metabólitos secundários de plantas, como flavonóides, quinonas, alcalóides e outros (Moreira et al., 2002). Derivados metabólicos de flavonóides, formados durante o processo de biotransformação no organismo humano, também podem apresentar o potencial mutagênico. Dessa forma, certos metabólitos, que pelo método de determinação de mutagenicidade, na ausência de ativação metabólica, não apresentam mutagenicidade, passam a apresentá-la na presença de metabolização (Wall et al., 1988).

Muitos alcalóides são reconhecidos pelo potencial farmacológico muito proeminente, apresentando atividade antimicrobiana, antiplasmodial e antitumoral (Kingston et al., 1978; Frederich et al., 1999); porém, muitos deles já demonstraram efeito genotóxico (Wang; Peng, 1996; Mei et al., 2004, 2005; Ansah et al., 2005).

De acordo com Nunes et al. (1992), alcalóides indólicos isolados de espécies do gênero *Aspidosperma* demonstraram efeitos mutagênicos em *Salmonella typhimurium*, em culturas de células mamárias e em células pulmonares, além de efeitos inibitórios sobre monoaminoxidase em tecido animal, crescimento e mitose de fibroblastos cardíacos. A atividade desses alcalóides em células de eucariontes e procariontes tem sido atribuída à sua capacidade de intercalação quando interagem com o DNA (Picada et al., 1997).

Foi verificado no extrato de *Nauclea latifolia*, rico em alcalóides e com ação antimalárica, interação *in vitro* com DNA de bactéria e células de mamíferos, levando ao arraste do ciclo celular e danos ao DNA, bem como indução *in vivo* da

quebra do DNA em fita simples no fígado, rim e células sanguíneas (Traore et al., 2000).

Ao alcalóide criptolepina, isolado do extrato aquoso das raízes de *Cryptolepis sanguinolenta* (Periplocaceae), também utilizado popularmente como antimalárico no oeste da África (Boye; Ampofo, 1983; Noamesi et al., 1991; Kirby et al., 1995; Wright et al., 1996, 2001), também foi verificado potencial efeito genotóxico. Recentes estudos têm indicado que a criptolepina possui a propriedade de intercalar DNA (Bonjean et al., 1998; Lisgarten et al., 2002) e que a prática popular do extrato aquoso de *C. sanguinolenta*, para tratamento contra a malária, pode apresentar um risco genotóxico (Ansah et al., 2005).

Outro exemplo de ação mutagênica atribuída a metabólitos secundários de plantas, tratam-se dos derivados antraquinônicos de *Aloe vera* (babosa), que ao serem submetidos ao teste de Ames com as linhagens TA1535, TA1537, TA98 e TA100 na concentração de 5mg/placa, verificou-se atividade mutagênica na cepa TA1537. Vale ressaltar, que o uso interno de preparações contendo babosa é uma prática popular em várias populações, inclusive no Brasil, o que representa um sério risco para o usuário (Parra et al., 2000).

Estudos epidemiológicos em humanos e experimentos em animais mostraram evidências substanciais de que as isoflavonas presentes na soja têm efeito benéfico sobre neoplasias relacionadas a hormônios, por exemplo, câncer de mama e próstata (Adlercreutz, 2002). Por outro lado, isoflavonas da soja e alguns de seus metabólitos têm sido relatados como portadores de propriedades genotóxicas (Munro et al., 2003; Lehmann et al., 2005).

Quanto a plantas utilizadas na medicina popular brasileira, estudos realizados por Ferreira e Vargas (1999), indicaram que no ensaio com *S. typhimurium*, os extratos de *Myrciaria tenella* Berg. (Myrtaceae), *Smilax campestris* Griseb. (Smilacaceae), *Tripodanthus acutifolius* Tiegh. (Loranthaceae) e *Cassia corymbosa* Benth. (Leguminosae), apresentaram atividade mutagênica, provavelmente devido à presença de flavonóides, taninos e antraquinonas nos extratos.

## 2.6 Espécies vegetais popularmente conhecidas como quina

Várias espécies do gênero *Cinchona*, família Rubiaceae, são fontes de alcalóides com ação antimalárica, como a quinina e seus derivados biossintéticos (Warhurst, 1987; Zevallos, 1989; Ocampo-Sanchez, 2000). A decocção das cascas secas de *Cinchona officinalis* é popularmente usada pelos povos da região Amazônica e pesquisas científicas dessas preparações mostram-se ativas contra *Plasmodium falciparum* e herpes (Warhurst, 1981). As cascas das espécies peruanas *Cinchona calisaya* e *Cinchona succirubra*, também popularmente conhecidas como quinas, representaram as primeiras fontes do alcalóide quinina (Bruce-Chwatt, 1988).

Em espécies vegetais da família Rubiaceae, principalmente do gênero *Cinchona*, os metabólitos de maior interesse são os alcalóides quinolínicos, quinina e quinidina, os quais apresentam grande emprego no arsenal terapêutico como antimaláricos. A associação popular de várias plantas que apresentam emprego para o tratamento da malária como essas espécies de *Cinchona* disseminou o nome “quina” para diferentes espécies vegetais, inclusive de famílias botânicas distintas. No Brasil, as espécies vegetais conhecidas vulgarmente como “quina” estão distribuídas em diferentes biomas, sendo empregadas na medicina tradicional com indicação para o tratamento de diversas patologias. Exemplos de espécies conhecidas como “quinas”, usadas para febre e malária, são *Deianira erubescens* Cham. e Schltdl. (Gentianaceae; folhas e raízes) e *Remijia ferruginea* (A.St.-Hil.) DC. (Rubiaceae; casca) (Andrade-Neto et al., 2003).

Entre as espécies popularmente conhecidas como quinas, sendo também empregadas como antimalárica na medicina popular estão a *Bathysa cuspidata*, a *Coutarea hexandra* e a *Strychnos pseudoquina*, sendo em todos os casos empregadas as cascas do caule, sugerindo possível atividade contra o vetor *Plasmodium falciparum*. No entanto, a essas espécies de quina também estão associados outros usos populares na medicina tradicional, como mostrado na Tabela 1 (Botsaris, 2007).

**Tabela 1** - Plantas popularmente conhecidas como “quina” usadas como antimalárica.

<b>Nome científico (família botânica)</b>	<b>Nome popular</b>	<b>Parte da planta utilizada</b>	<b>Indicações encontradas em estudos etnomedicinais</b>	<b>Origem e distribuição geográfica</b>
<i>Bathysa cuspidata</i> (St. Hil.) Hook. (Rubiaceae)	Quina do mato	Casca	febre, tônico amargo, eupéptico usado como substituto da quina contra malária.	Mata Atlântica
<i>Coutarea hexandra</i> (Jacq.) Schum. (Rubiaceae)	Quina-quina, Quina-brava, Quina-de-pernambuco, Quineira, Murta do mato	Casca	febre intermitente, pedras ou problemas na vesícula biliar, problemas digestivos, antitérmico e antimalárico.	Cerrado
<i>Strychnos pseudoquina</i> A. St. Hil. (Loganiaceae)	Quina do campo, Quina branca, Quineira, Quinagrossa, Quina do cerrado	Casca	esplenomegalia, hepatomegalia, febre intermitente, malária, problema gástricos, tônico do fígado, febrífugo, depurativo.	Cerrado

Fonte: Botsaris, 2007.

A essas três plantas conhecidas como quininas, pertencentes a mesma sub-classe Asteridae. As espécies desta sub-classe exploram polinização especializados e mecanismos especiais de apresentação de pólen e parecem estreitamente relacionadas à evolução de insetos capazes de reconhecer padrões florais complexos. Exploram também substâncias químicas diferentes das demais subclasses, tendo abandonado os taninos, as saponinas e o cianeto, em favor dos iridóides e alcalóides a eles relacionados. Cronquist (1998) infere ser o tremendo sucesso da sub-classe Asteraceae, mais provavelmente, relacionado a seu arsenal químico que à estrutura floral especializada. Este parentesco botânico poder levar a uma aproximação quimiosistemática entre as espécies (Tabela 2).

**Tabela 2** – Correlação sistemática das espécies *Strychnos pseudoquina*, *Coutarea hexandra* e *Bathysa cuspidata*.

Classe	Sub-classe	Ordem	Família	Espécie Vegetal
Magnoliopsida	Asteridae	Gentianales	Loganiaceae	<i>S. pseudoquina</i>
Magnoliopsida	Asteridae	Rubiales	Rubiaceae	<i>C. hexandra</i>
Magnoliopsida	Asteridae	Rubiales	Rubiaceae	<i>B. cuspidata</i>

As famílias botânicas de origem incluem espécies vegetais bastante conhecidas por biossintetizarem metabólitos secundários com atividade farmacológica pronunciada, podendo, em alguns casos, ser responsáveis pela toxicidade de plantas. Entre esses compostos tóxicos estão os alcalóides quinolínicos da família Rubiaceae; e alcalóides indólicos, como a estricnina encontrada na espécie *Strychnos nux-vomica*, da família Loganiaceae. Outros alcalóides do tipo  $\beta$ -carbolina também presentes nessas espécies são conhecidos como parasiticidas e por apresentarem citotoxicidade em células cancerosas (Rivas et al., 1999). Segundo Hoehne (1939) diferentes espécies vegetais conhecidas como quina são tóxicas para herbívoros, já que esses dificilmente atacam as folhas de tais plantas.

Uma preocupação ambiental quanto ao uso popular dessas três plantas nativas brasileiras diz respeito ao emprego das cascas no preparo de medicação, cuja coleta indiscriminada pode levar ao risco de extinção dessas espécies. Dessa forma, faz-se importante avaliar a atividade biológica de outro farmacógeno (parte da planta empregada para o preparo da droga vegetal), como as folhas dessas espécies. Caso esses apresentem composição fitoquímica semelhante ao caule, bem como segurança e eficácia comparável poder-se-ia utilizar preferencialmente as folhas no preparo dos medicamentos, uma vez que se trata de material vegetal de maior renovação, o que contribuiria para o manejo sustentável das espécies.

### **2.6.1 *Strychnos pseudoquina* St. Hil. (Loganiaceae)**

O gênero *Strychnos* (Família Loganiaceae) inclui 200 espécies de plantas distribuídas nas regiões tropicais do planeta. Muitas dessas espécies são

conhecidas pelo seu potencial medicinal e por características tóxicas de seus metabólitos secundários. Um importante metabólito conhecido de algumas espécies desse gênero é o alcalóide do tipo indólico conhecido como estricnina (Thongphasuk et al., 2003; Philippe et al., 2004). As espécies de *Strychnos* spp. têm sido intensamente estudadas durante décadas, o que possibilitou a descoberta de diversas propriedades farmacológicas como curarizante e tetanizante (Philippe et al., 2004), antiplasmodial (Frederich et al., 1999, 2002; Rasoanaivo et al., 1994), citotóxica (Bassleer et al., 1982; Frederich et al., 2003), antibacteriana (Caron et al., 1988), antifúngica (Quetin-Leclercq et al., 1995), antidiarréica (Thomas et al., 1992), diurética (Biswas et al., 2001), espasmolítica (Demedeiros et al., 1991), hipotensiva (Kapoor et al., 1988; Oliveira et al., 1996) e antiinflamatória (Tits et al., 1991). Philippe (2004) menciona que várias espécies americanas de *Strychnos*, como a *S. panamensis* e a *S. Tabascana*, biossintetizam alcalóides derivados da estricnina e, por esse fato, causam efeitos tetanizante. Esse autor também cita outras espécies asiáticas do mesmo gênero, como a *S. ignatii* e *S. wallichiana*, produtoras de uma série de alcalóides quaternários, que causam efeitos curarizantes.

*Strychnos pseudoquina* St. Hil. (Figura 1) é nativa do cerrado brasileiro, popularmente usada para tratamento de doenças hepáticas e gástricas (Correa, 1926; Santos et al., 2005), febres e malária (Andrade-Neto et al., 2003).



**Figura 1** - *Strychnos pseudoquina* St. Hil.

Estudos fitoquímicos realizados com essa espécie têm demonstrado a presença de alcalóides e flavonóides (Nicoletti et al., 1984; Silva et al., 2005). Investigações fitoquímicas de *S. pseudoquina* evidenciaram a presença de alcalóides bisnorhidroxitixiferina, diabolina e 11-metoxidiabolina, como também, dos flavonóides isoramnetina e estricnobilflavona (Nicoletti et al., 1984; Delle-Monache et al., 1969).

Apesar de muitos alcalóides terem demonstrado potencial farmacológico, exibindo atividades antimicrobiana, antiplasmodica e antitumoral (Frederich et al., 1999; Kingston et al., 1978), alguns desses são conhecidos por serem genotóxicos (Mori et al., 1985; Wang; Peng, 1996; Mei et al., 2004; Ansah et al., 2005). Da mesma forma, os flavonóides apesar de vários resultados indicarem atividade farmacológica e benéfico potencial para a saúde humana (Park et al., 2004; Toker et al., 2004), muitos também são descritos como possuidores de potencial mutagênico (Suzuki et al., 1991; Jurado et al., 1991).

Já que várias espécies do gênero *Strychnos* são conhecidas por conter componentes potencialmente tóxicos, faz-se importante conduzir investigação específica que vise avaliar a presença de componentes tóxicos (Angenot et al., 1990).

### **2.6.2 *Coutarea hexandra* (Jacq.) K. Schum (Rubiaceae)**

A família Rubiaceae, segundo Mabberley (1997), ocupa o quarto lugar em diversidade entre as Angiospermas, perdendo apenas para as Asteraceae, Orchidaceae e Fabaceae. A família inclui aproximadamente 637 gêneros e cerca de 10.700 espécies (Robbrecht 1988), que ocorrem principalmente nas regiões tropicais e subtropicais, atingindo, porém as regiões temperadas e frias da Europa e norte do Canadá (Barroso et al., 1986). A família Rubiaceae é dividida em quatro subfamílias: Antirheoideae, Cinchonoideae, Ixoroideae e Rubioideae, sendo que as principais classes de produtos naturais produzidos nessas subfamílias são: iridóides, alcalóides indolo-terpênicos, antraquinonas, triterpenos, e derivados de ácidos fenólicos (Trevisan et al., 1993).

Os estudos mais recentes sobre plantas do gênero *Coutarea* abordam principalmente questões pertinentes à distribuição, filogenia e ecologia (Araújo, 1997; McDowell et al., 2003; Ivizi). Para a espécie *Coutarea latiflora* foi detectada atividade antimalárica *in vitro* (Noster; Kraus, 1990), hipoglicemiante (Barbosa-Filho et al., 2005), bem como hemólise e rabdomiólise em seres humanos (Roca, 2003).

*Coutarea hexandra* (Jacq.) K. Schum (Figura 2), família Rubiaceae, conhecida como murta-do-mato, também como quina, quina-branca, quina-de-dom-diogo, quina-de-pernambuco, quina-do-pará, quina-do-piauí, quina-quina, quineira e outros. Árvore ou arvoreta, 3-5m altura, de tronco tortuoso e copa globosa, com inflorescência rósea em panícula e sendo seu fruto cápsula deiscente com sementes aladas membranosas, é planta bastante ornamental, sendo usada em paisagismo. Nativa do Brasil, amplamente distribuída em regiões úmidas da Amazônia e Mata Atlântica. Na medicina popular, a casca de sabor fortemente amarga, é usada contra febre intermitente, malária, paludismo, feridas e inflamações (Disponível em: <http://pt.wikipedia.org/wiki/Murta-do-mato>).



**Figura 2** - *Coutarea hexandra* (Jacq.) K. Schum.

Estudos fitoquímicos revelaram a presença de flavonóides (Reher et al., 1983) e cumarinas (Aquino et al., 1988) em extratos de *C. hexandra*. Algumas das cumarinas isoladas da *C. hexandra* também têm sido sintetizadas (Iinuma et al., 1987; Lucena et al., 2006).

O extrato aquoso da *Coutarea hexandra* administrado em camundongos e ratos administrado via oral, possui efeito antiinflamatório e antinociceptivo em três doses diferentes 100, 200 e 400mg/Kg mantendo-se o volume administrado de 0,1 mL/10g de animal. O efeito antinociceptivo do extrato aquoso não está relacionado a ativação dos sistemas opióide e adenosina e, ao menos em parte, é devido a atuação em nível central (Lucena et al., 2006).

### **2.6.3 *Bathysa cuspidata* (A.St.-Hil.) Hook.f. (Rubiaceae)**

Espécies dessa família, pertencente à mesma do gênero *Cinchona*, são facilmente reconhecidas pelas folhas simples, opostas e estípulas interpeciolares. A distribuição das espécies de *Bathysa*, no Brasil, restringe-se quase apenas a Mata Atlântica, estando, portanto, em sua maioria ameaçadas de extinção pelo impacto que esse ecossistema vem sofrendo pela ação antrópica. São árvores, arvoretas ou arbustos que atingem até doze metros. As espécies brasileiras são umbrófilas ou semiumbrófilas, crescendo à beira de caminhos ou riachos no interior das matas (Filho, 1999).

Algumas espécies de *Bathysa* estão incluídas entre as falsas quinas que, segundo Cunha (1937), englobam todas as plantas que contenham cascas de sabor amargo, de coloração avermelhada, amarelada ou acinzentada, capazes de fornecer uma alcoolatura ou decocto, usados como tônico ou febrífugo. As verdadeiras quinas diferem por possuir a quinina, presentes em pequenas concentrações como prevista pelo código farmacêutico. Dados da literatura mostram estudos fitoquímicos apenas para a espécie *B. meridionalis*, de onde foi isolado o paeonol, uma substância fenólica da via do acetato (Weeks et al., 1978; Thais et al., 2005).

A espécie *Bathysa cuspidata* (A.St.-Hil.) Hook.f. (Figura 3) ocorre na Serra do Mar nos Estados do Rio de Janeiro e São Paulo, região serrana de Minas Gerais e Espírito Santo e existe uma coleta, em mata de galeria, na Serra de Caldas, em Goiás e possui arbustos ou arvoretas com até 6 m e casca castanha (Filho, 1999). Correa (1984) afirma que as cascas constituem tônicos que são freqüentemente empregados na medicina popular para o tratamento de anemias,

caquexias, febres palustres, ancilostomíase, convalescência, além de fornecerem matéria corante.



**Figura 3** - *Bathysa cuspidata* (A.St.-Hil.) Hook.f

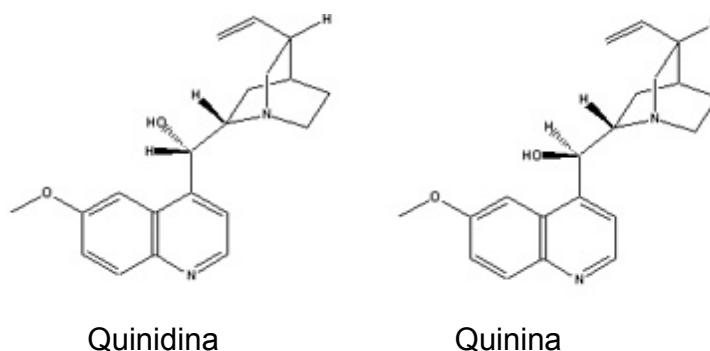
Estudos com extrato etanólico e fração diclorometânica de folhas de *B. cuspidata* mostraram possuir atividade antinociceptiva e antiinflamatória, em camundongos albinos tratados previamente por via oral com o veículo (tween 80, 1%) e 1000mg/Kg de extrato etanólico e com 500mg/kg de fração diclorometânica, podendo estes resultados explicar o uso popular desta espécie para doenças que envolvem inflamação e dor (Vanderlinde et al., 2001).

## **2.7. Alcalóides quinina e estricnina**

Do córtex do tronco e da raiz de espécies de *Cinchona sp* (quina), árvores naturais dos Andes, são extraídos mais de vinte alcalóides, dentre os quais dois pares de diastereoisômeros, quinina e quinidina, cinchonina e cinchonidina, têm atividade antimalárica. Até a 2ª Guerra Mundial, a quinina (Figura 4) era o único agente antiparasitário eficaz frente à malária. Após a introdução de derivados sintéticos, a quinina foi descartada. Entretanto, com o aparecimento de cepas resistentes de *Plasmodium*, este fármaco foi reintroduzido (Thais et al., 2005). Ele tem sido usado em infecções por *P. falciparum* resistente à cloroquina e no tratamento da malária severa (Ferreira, 1993).

A quinidina (Figura 4) o mais antigo dos antiarrítmicos específicos disponíveis, apresentando, ainda hoje, largo espectro terapêutico. Derivado da cinchona e dextro-isômero da quinina, a quinidina é muito mais ativa do que este sobre o aparelho cardiovascular, mas compartilha de seus efeitos antimaláricos, antipiréticos e oxitócitos (Disponível em: <http://www.bibliomed.com.br/lib/showdoc.cfm?LibCatID=-1&Search=intoxica%E7%E3o+digital&CurrentPage=0&LibDocID=11486>). A quinidina mostrou-se um antimalárico mais eficaz e mais tóxico que a quinina, em testes *in vitro* e *in vivo* (Karle et al., 1992).

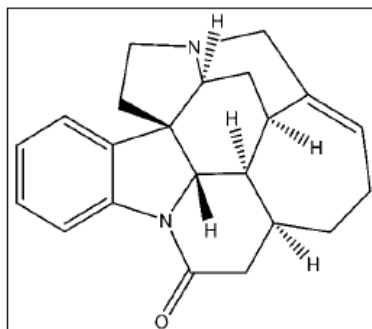
Estes alcalóides quinólicos pertencem a classe dos indolo-terpênicos. A biossíntese da quinina e quinidina envolve a condensação da triptamina e secologanina, levando a estriquitosidina, posteriormente ao corinanteol e finalmente após sucessivos rearranjos à quinina ou quinidina (Disponível em: <http://pt.wikipedia.org/wiki/Quinina>). Estes apresentam indicações para o tratamento de anginas precordiais e de escleroses, tendo também indicação analgésica e antipirética (Rea, 1995). A quinidina como antifibrilante é adequada ao tratamento preventivo da taquicardia (Prinz, 1990; Bruneton, 2001). Relatos da literatura indicam os alcalóides quinolínicos como portadores de atividade contra o vírus da batata (Verpoorte et al., 1988).



**Figura 4** – Estruturas dos alcalóides quinidina e quinina.

O alcalóide estricnina (Figura 5) é biossintetizado a partir do aminoácido triptofano. A biossíntese do seu esqueleto estrutural ocorre por via metabólica mista, envolvendo um caminho a partir do aminoácido triptofano e outro

relacionado a via mevalonato. Esse alcalóide é rapidamente absorvido pelo trato gastrointestinal, respiratório e pela pele (Greene; Meatherall, 2001; Lambert et al., 1981).



**Figura 5** - Estrutura do alcalóide estriçnina

A estriçnina é altamente tóxica para o homem, animais domésticos e, principalmente utilizada, como rodenticida. A dose letal para adultos humanos está entre 30 e 120mg, entretanto mortes de adultos têm sido relatadas depois da ingestão de 16mg do composto (Igor et al., 2008). Para crianças a dose letal fica em torno de 15mg (The Committee for Veterinary Medicinal Products, 1999; Borges et al., 2006). A estriçnina interfere inibindo a mediação pós-sináptica da glicina, causando bloqueios periódicos que leva a inibição da sinapse de células neuro-motoras, competindo, de forma antagonista, a ação da glicina liberada por estas células. A perda da inibição pós-sináptica resulta em excesso de atividade neuro-motora e, conseqüentemente, convulsões (Aprison et al., 1987; Aprison et al., 1995). O Sistema nevosu central envolvido pode trazer respostas exageradas no estímulo visual e auditivo (Cotten, Lane, 1966; Gosselin et al., 1984; Chan, 2002).

### 3. METODOLOGIA

#### 3.1 Materiais, métodos e equipamentos

- O material vegetal foi seco em sala ventilada, a aproximadamente 25°C, e submetido à moagem em moinho de facas.
- Para cromatografia em camada delgada (CCD) com espessura de 25 mm, foram utilizadas gel de sílica 60G Merck, artigo 7731, e cromatofolhas de alumínio de sílica gel GF<sub>254</sub> (Merk ®).
- As revelações cromatográficas foram feitas por irradiação em câmara escura (Modelo 20115) na região de luz ultravioleta em 254 e a 365nm, com ou sem o uso prévio de reação com reveladores específicos.
- A concentração dos extratos foi feita destilando-se o solvente, sob pressão reduzida, em evaporador rotatório.
- Os solventes utilizados foram das marcas Cromoline Química Fina Ltda Vetec Química Fina Ltda, de grau P.A e cromatográfico.
- Padrões dos alcalóides quinina e estricnina foram utilizados das marcas Fluka (Chemika) Lote: 22620 (NP) e Fluka (Biochemika) Lote: 85920 (NP), respectivamente.
- Os reagentes utilizados nos testes de mutagenicidade foram: Ágar - Micromed / Isofar Indústria e Comércio de Produtos Químicos, Histidina - Vetec Química Fina Ltda, Biotina - Inlab / Alamar Tecno-Científica Ltda, Glicose - Vetec Química Fina Ltda, Cloreto de sódio - Vetec Química Fina Ltda, meio Oxoid - Oxoid Ltda, Sulfato de magnésio heptahidratado - Vetec Química Fina Ltda, Ácido cítrico anidro - Vetec Química Fina Ltda, Fosfato de potássio dibásico - Vetec Química Fina Ltda, Fosfato de sódio amônio - Vetec Química Fina Ltda, Azida de Sódio - Vetec Química Fina Ltda, Nitrofenilenodiamino – Aldrich.
- Para CLAE utilizou-se cromatógrafo Merck-Hitachi, provido de injetor automático AS-2500, detector UV-VIS L-450, bomba L-6200A, integrador AS-2500 e coluna de 250 mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro interno

empacotada com sílica octadecilsilizada, do Laboratório Bioprospecção Farmacêutica, da Fundação Ezequiel Dias.

- Capela de fluxo laminar - Marconi Equipamentos Para Laboratório foi utilizada para os testes de avaliação de mutagenicidade.

### **3.2 Coleta e identificação do material vegetal**

As amostras de material vegetal de *C. hexandra* e *S. pseudoquina* foram coletadas em bioma de cerrado no município de Uberlândia – MG, pelo botânico André Furtado Carvalho, no mês de abril de 2007, sendo exsiccatas depositadas no herbário Uberlandense – HUFU com os seguintes códigos: *Coutarea hexandra* (HUFU 2124) e *Strychnos pseudoquina* (HUFU 10936). Já a espécie *Bathysa cuspidata* foi coletada em bioma de Mata Atlântica, no município de Araponga – MG, no mês de outubro de 2007 e exsicata depositada no Herbário da UFV, com o código VIC 21559.

As folhas e cascas do caule das espécies coletadas foram separadas e secadas em sala ventilada escura a temperatura ambiente, sendo posteriormente pulverizadas em moinho de faca e devidamente armazenadas.

### **3.3 Obtenção do extrato vegetal**

Os extratos foram preparados por maceração. Para esse procedimento, 100g do material vegetal foram pesados e transferidos para frasco âmbar, sendo, em seguida, adicionado 500mL de álcool etílico 95° GL. A droga vegetal foi deixada em contato com o solvente durante sete dias, sendo realizado diariamente agitação do frasco. Após este período o material foi filtrado em papel de filtro, e o extrato obtido evaporado em evaporador rotatório a baixa pressão. Posteriormente, sendo calculado o rendimento de cada extrato etanólico das espécies.

### **3.4 Prospecção fitoquímica**

Os testes realizados avaliaram a presença dos seguintes grupos de metabólitos secundários: cumarinas, flavonóides, antraquinonas, taninos, óleos essenciais, alcalóides, triterpenos/esteróides e glicosídeos cardiotônicos nos extratos etanólicos das folhas e cascas das três espécies vegetais. Para a revelação dos cromatogramas foram usados reveladores específicos para cada grupo de metabólitos secundários, sendo em alguns casos observados sob fluorescência em câmara escura na região de luz ultravioleta em 254 e a 365nm (Tabela 3).

A triagem fitoquímica foi realizada em cromatofolhas de sílica gel GF<sub>254</sub> (Merk ®), utilizando-se diferentes fases móveis e reagentes reveladores de acordo com Wagner et al. (1984). Na análise cromatográfica, para cada classe, foram utilizados padrões de referência, de forma a confrontar os resultados obtidos.

**Tabela 3** - Prospecção fitoquímica dos extratos etanólicos de folhas e cascas das espécies vegetais *Coutarea hexandra*, *Strychnos pseudoquina* e *Bathysa cuspidata*.

<b>Grupo Químico</b>	<b>Mistura eluente</b>	<b>Revelador</b>	<b>Amostra de referência</b>
Cumarinas	éter etílico: tolueno (1:1)	Solução de KOH a 5% em etanol	benzopirona
Flavonóide	acetato de etila: ácido fórmico: ácido acético glacial: água (55:5:5:12)	Solução de AlCl <sub>3</sub> a 5% em etanol	rutina
Antraquinonas	tolueno: acetona: clorofórmio (40:25:35)	Solução de KOH a 5% em etanol	1,8- diidroxiantraquinona
Taninos	tolueno: butanol: ácido acético: água (50:25:25:5)	Soluções de K <sub>3</sub> Fe(CN) <sub>6</sub> 1% e FeCl <sub>3</sub> 2% (1:1)	ácido pirogálico
Alcalóide	acetato de etila: metanol: água (20:7,5:5,5)	Reagente de Drangendorff	quinina e estricnina
Saponinas	clorofórmio: metanol (95:5)	Anisaldeído	18 β-glicirretínico
Heterosídeo Cardiotônico	acetato de etila: metanol: água (81:11:8)	Reagente de Kedde (Solução A e B (1:1))	digitoxina
Triterpenos e esteróides	hexano: acetato de etila (70:30)	Reagente de Lieberman Burchard	β- sitosterol

### 3.5 Obtenção dos perfis cromatográficos por CLAE dos extratos vegetais

As análises por CLAE foram realizadas no laboratório de Bioprospecção Farmacêutica na Fundação Ezequiel Dias – FUNED em Belo Horizonte no mês de abril de 2008. A primeira condição utilizada para a obtenção dos perfis cromatográficos, foi empregado sistema gradiente binário de eluição utilizando mistura de acetonitrila e água (10:90), até 100% de acetonitrila em 30 min e mantendo esta condição até 40 min. A detecção foi realizada com espectrofotômetro UV na região de 220 nm, pelo fato desse comprimento de onda ocorrer absorção de uma grande quantidade de metabólitos secundários (Tabela 4).

**Tabela 4** – Gradiente de eluição empregado na análise por CLAE-FR dos extratos etanólicos de folhas e cascas das espécies vegetais com detecção em UV 220nm.

Tempo (minutos)	Solvente A (%)	Solvente B (%)
0	90	10
30	0	100
40	0	100

Nota – Solvente A: água; solvente B: acetonitrila.

Na segunda condição, também por gradiente, iniciou-se no tempo 0 com acetonitrila: água (30-70) até 90% de acetonitrila em 30 min, mantendo esta condição até 40 min. Utilizou-se detector UV na região de 254nm, pois neste comprimento de onda ocorre maior seletividade para a detecção de compostos, detectando, principalmente, compostos aromáticos e com alta ressonância eletrônica (Tabela 5).

Em ambos os experimentos foi utilizado fluxo de 1 mL/min.

**Tabela 5** – Gradiente de eluição empregado na análise por CLAE-FR dos extratos etanólicos das cascas e folhas das espécies vegetais com detecção em UV em 254nm.

<b>Tempo (minutos)</b>	<b>Solvente A (%)</b>	<b>Solvente B (%)</b>
0	70	30
30	10	90
40	10	90

Nota – Solvente A: água; solvente B: acetonitrila.

Na preparação da amostra, foi pesado cerca de 1 mg de cada extrato, sendo esse diluído em mistura de 0,5 mL de acetonitrila e 0,5 mL de água mili-Q. Realizou-se a dissolução em ultra-som, por 15 minutos. Nas análises, foram injetados 10  $\mu$ L de cada amostra por injeção automática.

### **3.6 Quantificação de polifenóis totais, proantocianidinas e flavonóides nos extratos vegetais**

#### **3.6.1 Polifenóis totais e proantocianidinas**

##### *3.6.1.1 Obtenção do extrato para quantificação de polifenóis totais e proantocianidinas*

Adicionou-se 1,0g do material vegetal pulverizado em um balão de fundo plano. Em seguida, verteram-se 200 mL de água destilada e levou-se ao aquecimento sob refluxo por 30 minutos. Após o aquecimento, o extrato foi resfriado e transferido para um balão volumétrico de 250 mL, completando-se o volume com água. O extrato foi deixado em repouso, para decantação, e filtrado, em papel de filtro qualitativo, descartando-se os primeiros 10 mL do filtrado. Empregou-se o filtrado restante para a quantificação de polifenóis totais e de proantocianidinas. Para todas as amostras foram realizadas análises em triplicata, tanto para a quantificação de polifenóis totais, como para as proantocianidinas.

### 3.6.1.2 Quantificação de polifenóis totais

Para a quantificação de polifenóis totais utilizou-se a técnica descrita por Simone et al. (2007). Esta determinação foi realizada em equivalentes de pirogalol.

Para a construção da curva de calibração de polifenóis totais foi realizada em um balão volumétrico de 100mL foram solubilizados 4,0 mg de pirogalol. Posteriormente, foram transferidos 5,0 mL desta solução para outro balão volumétrico de 100 mL, avolumando-se com água. Alíquotas de 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1,0 mL desta última solução, correspondente a 4, 8, 16, 24, 32, 40µg de pirogalol, respectivamente, foram transferidas para tubos de ensaio, em triplicata. A cada tubo de ensaio acrescentou-se água, reagente de Folin- Ciocalteu e solução de carbonato de sódio a 15%, de acordo com a Tabela 6.

**Tabela 6** - Concentrações diluídas das soluções referências de pirogalol utilizadas na construção da curva de calibração de polifenóis totais por espectrofotometria.

Tubos	Solução Padrão (mL)	H <sub>2</sub> O (mL)	Reagente de Folin- Ciocalteu (mL)	Solução Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> a 15% (mL)	Concentração de pirogalol final (µg/mL)
1	0,1	6,9	2,0	1,0	0,4
2	0,2	6,8	2,0	1,0	0,8
3	0,4	6,6	2,0	1,0	1,6
4	0,6	6,4	2,0	1,0	2,4
5	0,8	6,2	2,0	1,0	3,2
6	1,0	6,0	2,0	1,0	4,0

As soluções, depois de homogeneizadas, foram deixadas em repouso por 60 minutos, sendo determinada a absorvância em 760 nm, no espectrofotômetro. Os dados obtidos foram submetidos à análise de regressão linear, pelo método

dos mínimos quadrados, sendo calculada a equação da reta e o coeficiente de correlação ( $r^2$ ).

Na quantificação de polifenóis totais nas amostras, uma alíquota de 5,0 mL do filtrado (item 3.6.1.1) foi transferida para um balão volumétrico de 50 mL, completando-se o volume com água. Posteriormente, 1,0 mL desta última diluição foi transferido para um tubo de ensaio, adicionando-se em seguida 6,0 mL de água. Após agitação, adicionou-se 2,0 mL do reagente Folin-Ciocalteu, misturando-se novamente por agitação. Após três minutos à adição do reagente, adicionou-se 1,0 mL da solução de carbonato de sódio a 15% p/v. A solução, depois de homogeneizada, foi deixada em repouso por 30 minutos, sendo determinada a absorvância em 760 nm, no espectrofotômetro. Uma amostra em branco foi realizada utilizando-se água destilada em substituição ao extrato aquoso das folhas e cascas.

#### *3.6.1.3 Quantificação de proantocianidinas*

Para a quantificação de proantocianidina utilizou-se a técnica descrita por Price et al. (1980), com algumas adaptações. Esta determinação foi realizada em equivalentes de catequina.

Para a construção da curva de calibração para proantocianidinas foi realizada em um balão volumétrico de 50mL foram solubilizados 20mg de catequina, em metanol, completando-se o volume com este solvente. Em seguida alíquotas de 0,1; 0,2; 0,4; 0,8 e 1,0 mL desta última solução foram transferidas para tubos de ensaios. Completou-se o volume para 1,0 mL com metanol. Em seguida, procedeu-se de acordo como descrito na Tabela 7.

**Tabela 7** – Concentrações das soluções referência de catequinas utilizadas na construção da curva de calibração de proantocianidinas por espectrofotometria

<b>Tubos</b>	<b>Solução Padrão (mL)</b>	<b>Metanol (mL)</b>	<b>Reagente Vanilina (mL)</b>	<b>Concentração de catequina final (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>
<b>1</b>	0,1	0,9	5,0	6,6
<b>2</b>	0,2	0,8	5,0	13,3
<b>3</b>	0,4	0,6	5,0	26,7
<b>4</b>	0,8	0,2	5,0	53,3
<b>5</b>	1,0	-	5,0	66,7

As soluções, depois de homogeneizadas, foram deixadas em repouso por 20 min, sendo determinada a absorvância em 500 nm, no espectrofotômetro.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de regressão linear, pelo método dos mínimos quadrados, sendo calculada a equação da reta e o coeficiente de correlação ( $r^2$ ).

Na quantificação de proantocianidinas nas amostras, em tubos de ensaios foram adicionados 5,0 mL do reagente de vanilina, e após intervalo de 1 minuto, adicionou-se 1,0 mL do filtrado. Para a realização do branco, no lugar da amostra foi substituída por metanol. A leitura foi realizada em espectrofotômetro, em 500 nm, após o intervalo de 20 min.

### **3.6.2 Flavonóides**

Para a quantificação de flavonóides utilizou-se a técnica descrita por Lamaison e Carnet (1990) com algumas adaptações. Esta determinação foi realizada em equivalentes de rutina.

Para a construção da curva de calibração para flavonóides, foram pesados 5,0 mg de rutina e transferidos para um balão volumétrico de 10 mL, com auxílio de 6,0 mL de metanol. Esta solução foi mantida em banho de ultra-som, por 5 minutos, e o volume foi completado com metanol. Alíquotas de 0,1; 0,25; 0,5; 1,5; 2,0; 2,5 mL desta solução, correspondentes a 0,050; 0,125; 0,250; 0,750; 1,000 e

1,250 mg de rutina foram transferidas para um balão volumétrico de 25 mL. Para cada fração, completou-se o volume para 2,0 mL pela adição de metanol. Em seguida, adicionaram-se a cada fração, 0,6 mL de ácido acético glacial, 10 mL de metanol e 2,5 mL de solução metanólica de cloreto de alumínio a 8%, completando-se, ao final, para 25,0 mL de água (Tabela 8). A leitura de absorvância foi realizada em 420nm, construindo-se assim, a curva de calibração.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de regressão linear, pelo método dos mínimos quadrados, sendo calculada a equação da reta e o coeficiente de correlação ( $r^2$ ).

**Tabela 8** – Concentrações das diluições a partir da solução referência de rutina utilizadas na construção da curva de calibração de flavonóides por espectrofotometria

<b>Tubos</b>	<b>Solução Padrão (mL)</b>	<b>Metanol (mL)</b>	<b>Solução metanólica de AlCl<sub>3</sub> (mL)</b>	<b>Ácido acético glacial (mL)</b>	<b>Concentração de rutina final (µg/mL)</b>
<b>1</b>	0,10	11,90	2,50	0,60	6,6
<b>2</b>	0,25	11,75	2,50	0,60	13,3
<b>3</b>	0,50	11,50	2,50	0,60	26,7
<b>4</b>	1,50	10,50	2,50	0,60	40,0
<b>5</b>	2,00	10,00	2,50	0,60	53,3
<b>6</b>	2,50	9,50	2,05	0,60	66,7

### 3.6.2.1 – Obtenção do extrato flavônico

Foram pesados 2,0g do material vegetal pulverizado e transferidos para balões de fundo plano e depois foi adicionado 25mL de metanol. A solução foi levada ao aquecimento sob refluxo durante 30 minutos. Após o aquecimento, a solução foi filtrada com papel de filtro, e o extrato obtido foi transferido, quantitativamente, para um balão volumétrico de 50mL. O resíduo do material vegetal foi lavado com 25 mL de metanol e filtrado, sendo reunido ao volume obtido anteriormente. Ao final, o volume no balão volumétrico foi completado,

utilizando-se metanol como solvente. As análises foram realizadas em triplicata. Na semi-purificação do extrato metanólico, foram retirados, também em triplicata, 8,0 mL do extrato metanólico do balão volumétrico e transportados para tubos de ensaio. A seguir adicionou-se ao tubo, 4,0 mL de clorofórmio e 4,0 mL de água destilada, nessa ordem. Esta mistura foi homogeneizada e posteriormente centrifugada por aproximadamente 1 min, até completa separação das duas fases. O sobrenadante, resultado da centrifugação, foi retirado com uso da pipeta de Pasteur, para quantificação de flavonóides da amostra. A quantificação de flavonóides totais nas amostras foi realizada em um balão volumétrico de 25 mL onde foram colocados 5,0 mL do extrato metanólico semi-purificado, obtida anteriormente (item 3.6.2.2.1). Ao extrato adicionaram-se 0,6 mL de ácido acético, 10 mL de metanol e 2,5 mL da solução de cloreto de alumínio hexahidratado 8% em metanol, tendo o volume completado com água destilada. Para realização do branco, em outro balão volumétrico de 25mL foram adicionados 5,0 mL de um dos extratos, 0,6mL de ácido acético, 10mL de metanol, e o volume foi completado com água. Após um intervalo de 15 minutos, realizou-se a leitura de absorvância da solução em espectrofotômetro, na região de 420 nm.

### **3.7 Teste de Ames**

#### **3.7.1 Linhagens utilizadas**

Foram utilizadas as linhagens TA98 e TA100 de *Salmonella typhimurium*, gentilmente cedidas pela Profa. Dra. Eliana Varanda, UNESP, Araraquara-SP. A cepa TA98 apresenta mutação no gene *hisD* (*hisD3052*) que codifica para a enzima 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 GGG (CCC) – prolina – por GAG (CTC) – leucina. Assim, essa cepa detecta agentes

mutagênicos que ocasionam substituições, principalmente neste par G-C (Maron e Ames, 1983).

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

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).

### **3.7.2 Preparo dos inóculos de *S. typhimurium* utilizados no ensaio**

Com auxílio de alça de inoculação, pequena quantidade da cultura estoque congelada foi inoculada em 30mL de caldo nutriente (Oxoid n. 2), incubada a 37°C, por 12-16 horas, em banho-maria com agitação (160 rpm), de modo a obter uma densidade de  $1-2 \times 10^9$  UFC/mL.

### **3.7.3 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). Nos ensaios de mutagenicidade foram usados 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, 500g de fosfato de potássio dibásico e 670 mL de água destilada) na proporção de 980mL para 20 mL respectivamente.

O ágar de superfície ("top ágar") foi composto por 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 e D-biotina 0,123 mg/mL. Os meios de cultura foram preparados e esterilizados em autoclave a 121°C por 15 minutos.

#### **3.7.4 Controles**

O controle negativo foi realizado com DMSO, o solvente empregado para a diluição dos extratos vegetais. Os ensaios foram realizados 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-Nitrofenilenodiamina (NPD) para as linhagens TA98 e Azida Sódica para a linhagem TA100.

#### **3.7.5 Ensaios de mutagenicidade**

De acordo com a metodologia de pré-incubação, desenvolvida por Maron e Ames (1983), diferentes concentrações dos extratos vegetais foram misturadas a 0,5 mL de tampão fosfato 0,2M pH 7,4, 0,1 mL de cultura de bactérias e incubadas de 20-30 minutos a 37°C. Decorrido o tempo de incubação, 2 mL de “top ágar”, contendo traços de L-histidina e D-biotina, foram adicionados à mistura presente nos tubos. O conteúdo de cada tubo, assim composto, foi levemente homogeneizado em vórtex e vertido sobre a superfície de uma placa contendo ágar mínimo glicosado. Após solidificação do “top ágar”, as placas foram incubadas por 48 horas, a 37°C. Ao término desse período, foi realizada a contagem do número de colônias revertentes por placa. Os ensaios foram realizados em triplicata.

#### **3.7.6 Análise estatística dos resultados**

Os dados da mutagenicidade dos extratos vegetais foram analisados utilizando 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. A Análise de Variância (ANOVA) é um procedimento estatístico para análise de testes de hipótese, utilizado na comparação de médias de dois ou mais tratamentos de uma amostra.

Além da análise de variância, 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 dividido pela média do número de revertentes por placa do controle negativo (reversões espontâneas). As amostras foram consideradas com resultado positivo para o teste de Ames 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 com resultado negativo para o teste de Ames, quando a mesma não induziu aumento significativo no número de revertentes e seus RM foram todos menores que 2.

Quando houve uma diferença estatisticamente significativa entre o grupo tratado e o controle negativo, mas a razão de mutagenicidade foi menor que 2, as amostras foram consideradas como causadoras de indícios de mutagenicidade. Isso significa dizer que a amostra apresenta em sua constituição compostos capazes de ocasionar danos ao DNA, mas nas condições empregadas, sua mutagenicidade não foi efetiva.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1 Rendimento dos extratos etanólicos secos

O extrato etanólico seco foi pesado, sendo calculado o seu rendimento (Tabela 9).

**Tabela 9** – Rendimento de resíduos secos dos extratos etanólicos das folhas e cascas das espécies vegetais *Coutarea hexandra*, *Strychnos pseudoquina* e *Bathysa cuspidata*.

<b>Espécies</b>		<b>Sigla</b>	<b>Rendimento (%)</b>
<i>Coutarea hexandra</i> -	Folha	CHF	13,47
	Casca	CHC	13,13
<i>Strychnos pseudoquina</i>	Folha	SPF	8,81
	Casca	SPC	10,99
<i>Bathysa cuspidata</i>	Folha	BCF	13,8
	Casca	BCC	20,6

Pelos resultados expressos nesta tabela, pode-se perceber que os extratos etanólicos secos das folhas e cascas da espécie *B. cuspidata* apresentaram maior rendimento em relação às outras espécies.

### 4.2 Prospecção Fitoquímica

Estudos etnofarmacológicos sobre o emprego das três espécies de quina analisadas no presente trabalho apontam a casca como principal farmacógeno dessas plantas a ser utilizado nas preparações caseiras (Botsaris, 2007). No entanto, a extração de cascas e raízes de plantas nativas, ainda não domesticadas, sem as devidas estratégias de conservação e manejo sustentável, torna essas espécies “vulneráveis” ou mesmo “em perigo de extinção”. Assim, a falta de sustentabilidade na exploração de plantas medicinais, sobretudo quando se utilizam partes do vegetal de lenta regeneração, pode provocar a escassez de

plantas na floresta. Além disso, existe uma carência de estudos científicos sobre a adaptação de espécies vegetais nativas, visando o cultivo doméstico.

Nesse sentido, optou-se, no presente trabalho, realizar um estudo prévio comparativo do perfil fitoquímico, bem como do potencial de mutagenicidade, das cascas do caule e folhas para cada espécie. Uma semelhança da composição de metabólitos secundários entre esses dois materiais vegetais, poderia motivar à investigação de atividade farmacológica também das folhas, apesar de serem as cascas, a parte utilizada nas medicações caseiras.

Na prospecção fitoquímica de grupos de metabólitos secundários por CCD nos extratos etanólicos das folhas e cascas das espécies *C. hexandra*, *S. pseudoquina* e *B. cuspidata*, em todos os extratos avaliados não foi detectada a presença de antraquinonas, saponinas e heterosídeos cardiotônicos.

Os resultados da prospecção fitoquímica realizada com os extratos etanólicos de cascas e folhas de *C. hexandra*, *S. pseudoquina* e *B. cuspidata* (item metodologia, pág. 38) estão apresentados na Tabela 10.

**Tabela 10** - Resultados da prospecção fitoquímica, por CCD dos extratos etanólicos de cascas e folhas de *Coutarea hexandra*, *Strychnos pseudoquina* e *Bathysa cuspidata*.

Classe de metabólitos secundários	CHF	CHC	SPF	SPC	BCF	BCC
Antraquinonas	-	-	-	-	-	-
Saponinas	-	-	-	-	-	-
Heterosídeos cardiotônicos	-	-	-	-	-	-
Triterpenos e Esteróides	+	+	+	+	+	+
Flavonóides	+	+	+	+	+	+
Taninos	+	+	+	+	+	+
Cumarinas	-	+	-	+	-	+
Alcalóides	-	+	-	+	-	+

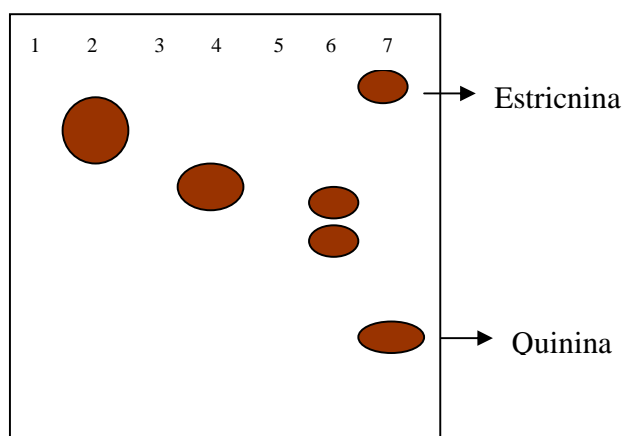
**Nota** - + :presente; - :ausente. CHF: extrato de folhas de *C. hexandra*; CHC: extrato de cascas de *C. hexandra*; SPF: extrato de folhas de *S. pseudoquina*; SPC: extrato de casca de *S. pseudoquina*; BCF: extrato de folhas de *B. cuspidata*; BCC: extratos de cascas de *B. cuspidata*

Os resultados para detecção de triterpenos/esteróides, flavonóides e taninos foram positivos para todas as espécies, em ambos farmacógenos, folhas e cascas. A ocorrência de triterpenos, taninos e de flavonóides é relatada na literatura em espécie da família Rubiaceae, como nas folhas de *Rudgea viburnoides*, planta bastante comum na região do cerrado brasileiro, conhecida popularmente como porangaba (Young et al., 1998; Alves et al., 2004). Em folhas e cascas da espécie *Remijia ferruginea* (Rubiaceae), também conhecida como quina, existe relato da presença de iridóides, triterpenos e esteróides, cumarinas, alcalóides e flavonóides (Braga et al., 2003).

Quanto à presença de cumarinas, verificou-se, nos experimentos realizados, a presença desse grupo de metabólitos somente nos extratos das cascas das três espécies. Estudos fitoquímicos já realizados em extratos de *C. hexandra* revelaram a presença de flavonóides (Reher et al., 1983; Iinuma et al., 1987; Dellemonache et al., 1989) e cumarinas (Aquino et al., 1988; D'agostino et al., 1989a; D'agostino et al., 1989b; D'agostino et al., 1990; Dellemonache et al., 1983; Dellemonache et al., 1984; Dellemonache et al., 1990). Na espécie *S. pseudoquina* foi relatado na literatura que suas folhas possuem triterpenos e esteróides, flavonóides, cumarinas e alcalóides (Mendonça et al., 2007).

Quanto à análise da presença de alcalóides nos extratos, os produtos naturais quinina e estriçnina foram utilizados como padrões, uma vez que esses compostos e seus derivados são comumente encontrados em outras espécies pertencentes às mesmas famílias botânicas das três espécies avaliadas em nosso estudo. Metabólitos alcaloídicos são encontrados em diversas espécies medicinais da família Rubiaceae, como ipeca (*Psychotria ipecacuanha*), quinas (*Cinchona* spp) e unha-de-gato (*Uncaria tomentosa*). Em algumas espécies do gênero *Psychotria* (Rubiaceae), os alcalóides ocorrem nas folhas e possuem propriedades analgésicas (Elisabetsky et al., 1997). Pertencente à família Loganiaceae, espécies do gênero *Strychnos* são bem conhecidas como plantas portadoras de alta toxicidade, sendo essa propriedade atribuída principalmente ao alcalóide estriçnina e seus derivados (Philippe et al., 2004). Na investigação da presença dos alcalóides quinina e estriçnina (Figura 6) nas espécies estudadas por CCD,

pode-se observar a ausência desses compostos nos extratos etanólicos de *B. cuspidata*, *C. hexandra* e *S. pseudoquina*. Mas, não descartando a possibilidade dos alcalóides encontrados nas cascas das espécies vegetais sejam derivados dos alcalóides quinina e estricnina.



**Figura 6** – Esquema do cromatograma obtido da cromatofolha de sílica gel GF<sub>254</sub> revelada com reagente de Drangendorff. Fase móvel: acetato de etila- metanol – água (20:7,5:5,5). 1. *C. hexandra* folha; 2. *C. hexandra* casca, 3. *S. pseudoquina* folha; 4. *S. pseudoquina* casca, 5. *B. cuspidata* folha; 6. *B. cuspidata* casca e 7. mistura dos padrões de alcalóides quinina e estricnina.

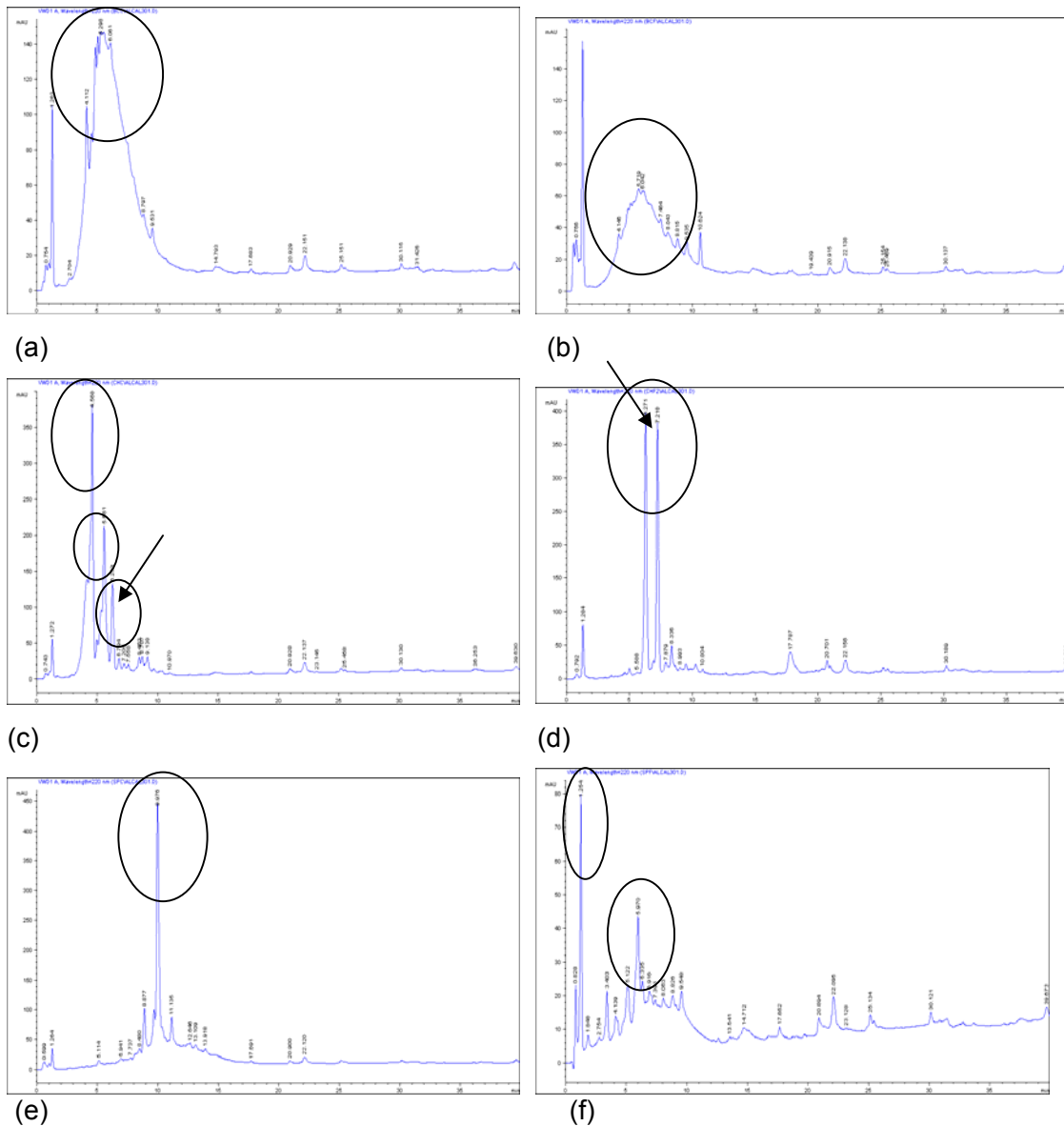
De maneira geral, pode-se perceber que entre as espécies vegetais estudadas, *C. hexandra*, *B. cuspidata* e *S. pseudoquina*, popularmente conhecidas como quinas, apresentam semelhança quanto à presença das classes de metabólitos secundários avaliados e diferem quimicamente dentro de cada espécie ao se comparar os farmacógenos folhas e caule, principalmente em relação à presença de cumarinas e alcalóides. Estudos mais aprofundados devem ser realizados na tentativa de correlacionar atividade farmacológica com grupo de metabólitos secundários e/ou com princípios ativos.

### 4.3 Perfis cromatográficos (CLAE)

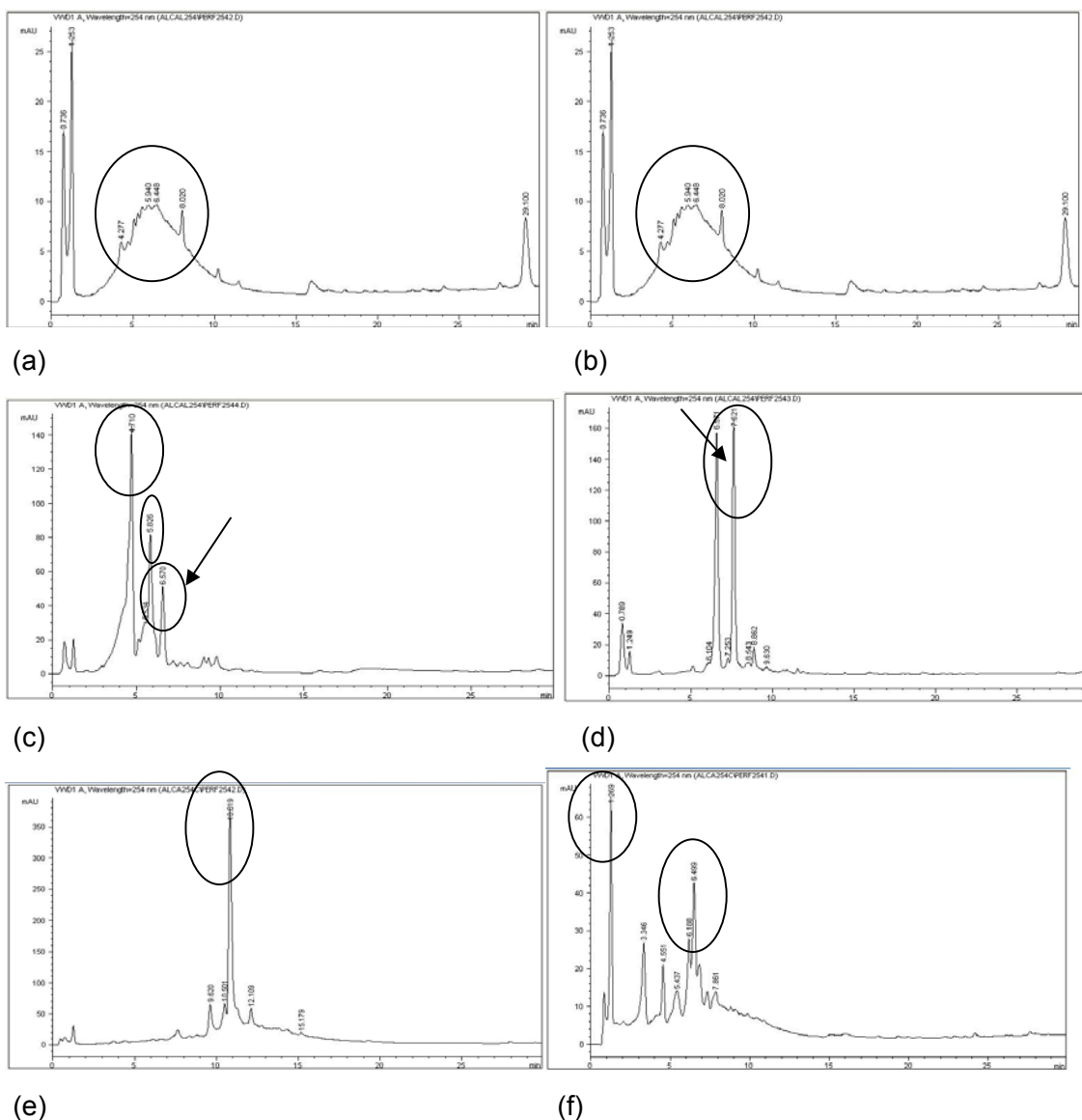
A utilização da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) conjugada à técnica de detecção por espectrômetro na região do ultravioleta é uma ferramenta muito útil na caracterização do perfil químico de plantas, permitindo caracterizar simultaneamente as substâncias constituintes ou seus principais grupos estruturais (Selma et al., 2002). A análise por CLAE aliada ao perfil fitoquímico, busca verificar comparativamente a composição química dos extratos vegetais analisados.

Após avaliação de diferentes condições cromatográficas para a realização do experimento por CLAE-FR, foram selecionadas duas condições. Na Figura 7 e 8 encontram-se os cromatogramas obtidos nas condições cromatográficas 1 e 2, respectivamente, avaliadas para extratos de cascas e folhas das espécies *B. cuspidata*, *C. hexandra* e *S. pseudoquina*.

Para os extratos etanólicos de cascas e folhas de *B. cuspidata*, os cromatogramas das Fig. 7a e 7b, respectivamente, obtidos com detecção em comprimento de onda 220nm, indicam constituição majoritária de compostos polares, sendo grande parte dos compostos eluídos entre os tempos de retenção 2,7 e 9,5 min, o que levou a uma sobreposição de picos. Esse fato pode ser explicado pela presença de composto polifenólicos, como flavonóide e taninos, em ambos os extratos, como demonstrado pelos resultados da prospecção fitoquímica por CCD. O mesmo ocorre para os extratos etanólicos das cascas (8a) e folhas (8b) de *B. cuspidata* quando analisados em 254nm, com semelhança na faixa de eluição dos compostos.



**Figura 7** – Cromatogramas de CLAE-FR de extratos etanólicos na condição 1: (a) extrato de cascas de *B. cuspidata*; (b) extrato de folhas de *B. cuspidata*; (c) extrato de cascas de *C. hexandra*; (d) extrato de folhas de *C. hexandra*; (e) extrato de cascas de *S. pseudoquina*; (f) extrato de folhas de *S. pseudoquina*. Condições cromatográficas: coluna C18 Hipersil 150x4,6mm, fluxo 1 mL/min, utilizando sistema gradiente com mistura acetonitrila e água, com detecção UV em 220nm. Picos majoritários circulos nos cromatogramas em: (a) 2,7 a 9,5 min.; (b) 2,7 a 9,5 min.; (c) 4,5; 5,5 e 6,2 min.; (d) 6,2 e 7,2 min.; (e) 9,9 min.; (f) 1,2 e 5,9 min. As setas indicam picos em comum entre as folhas e cascas da mesma espécie.



**Figura 8** – Cromatogramas de CLAE-FR de extratos etanólicos na condição 2: (a) extrato de cascas de *B. cuspidata*; (b) extrato de folhas de *B. cuspidata*; (c) extrato de cascas de *C. hexandra*; (d) extrato de folhas de *C. hexandra*; (e) extrato de cascas de *S. pseudoquina*; (f) extrato de folhas de *S. pseudoquina*. Condições cromatográficas: coluna C18 150x4,6mm, fluxo de 1 mL/min, sistema gradiente com mistura acetonitrila e água, com detecção UV em 254nm. Picos majoritários circulos nos cromatogramas em: (a) 2,7 a 9,5 min.; (b) 2,7 a 9,5 min.; (c) 4,7; 5,8 e 6,5 min.; (d) 6,5 e 7,6 min.; (e) 10,6 min.; (f) 1,2 e 6,4 min. As setas indicam picos em comum entre as folhas e cascas da mesma espécie.

Quanto aos cromatogramas referentes aos extratos etanólicos para cascas (7c) e folhas (7d) de *C. hexandra*, dentro da condição 1, os respectivos perfis cromatográficos mostram diferença entre a composição química desses dois extratos. O cromatograma referente ao extrato das cascas apresenta três picos majoritários com tempos de retenção em 4,5; 5,5 e 6,2 min, enquanto dentro das mesmas condições cromatográficas, o cromatograma referente às folhas, pode-se observar a presença de dois picos majoritários nos tempos de retenção 6,2 e 7,2 min. Entre os extratos das cascas e folhas verifica-se um pico em comum de tempo de retenção 6,2; o que leva a suspeita que seja referente a um mesmo metabólito. Quanto aos cromatogramas referentes aos extratos etanólicos para cascas e folhas de *C. hexandra* dentro da condição 2 (Fig. 8c e Fig. 8d), também observa-se diferença entre a composição química desses dois extratos. O cromatograma registrado sob luz UV 254nm referente ao extrato das cascas apresenta também três picos majoritários com tempos de retenção 4,7; 5,8 e 6,5 min, enquanto dentro das condições cromatográficas 2, o cromatograma referente às folhas (8d), pode-se observar a presença de dois picos majoritários nos tempos de retenção 6,5 e 7,6 min, com perfil semelhante à aquele obtido para o mesmo material vegetal dentro da primeira condição. Pode-se verificar um pico em comum entre os extratos das folhas e cascas de *C. hexandra*, com tempos de retenção 6,5 min; reforçando a suspeita que esse pico se trata de um mesmo metabólito. A propriedade de absorção dos compostos químicos em comprimento de onda mais alto (254nm), dentro do espectro de luz UV, sugere a identidade fenólica dos compostos responsáveis pelo aparecimento dos picos majoritários nos cromatogramas referentes a cascas e folhas de *C. hexandra*. Estudos mais aprofundados de isolamento fitoquímico precisam ser realizados para a confirmação dessa hipótese.

Os perfis cromatográficos obtidos por CLAE para os extratos etanólicos de cascas (7e) e folhas (7f) de *S. pseudoquina*, usando a condição 1, pode-se observar que para o cromatograma das cascas, destaca-se a presença majoritária

de um pico com tempo de retenção 9,9 min. No cromatograma das folhas dessa espécie (7f) ocorre uma sobreposição de picos entre os tempos de retenção 3,4 e 9,5 min, sendo detectado dois picos majoritários no tempo de retenção 1,2 e 5,9 min. Também foram observadas diferenças na impressão digital dos extratos etanólicos para cascas (8e) e folhas (8f) de *S. pseudoquina* na condição 2. No cromatograma das cascas também foi detectado a presença majoritária de um pico com tempo de retenção em 10,6 min, indicando a propriedade fenólica do metabólito responsável por esse pico. No cromatograma referente às folhas ocorre uma grande quantidade de picos na mesma faixa de retenção obtida pela condição 1, sendo detectados dois picos majoritários no tempo de retenção 1,2 e 6,4 min.

Desse modo, pode-se verificar que, com exceção dos extratos de cascas e folhas de *B. cuspidata*, para os demais extratos foram observados grande diferença nos perfis cromatográficos desses farmacógenos dentro da mesma espécie, o que pode levar, conseqüentemente, a uma diferença na resposta farmacológica de preparados realizados a partir dessas duas fontes.

Os perfis cromatográficos obtidos por CLAE também permitiu concluir uma grande diferença dos perfis cromatográficos entre as espécies, o que corrobora para a diferenciação entre as drogas vegetais popularmente conhecidas como quina.

#### **4.4 Quantificação de polifenóis totais, proantocianidinas e flavonóides em cascas e folhas de três espécies vegetais**

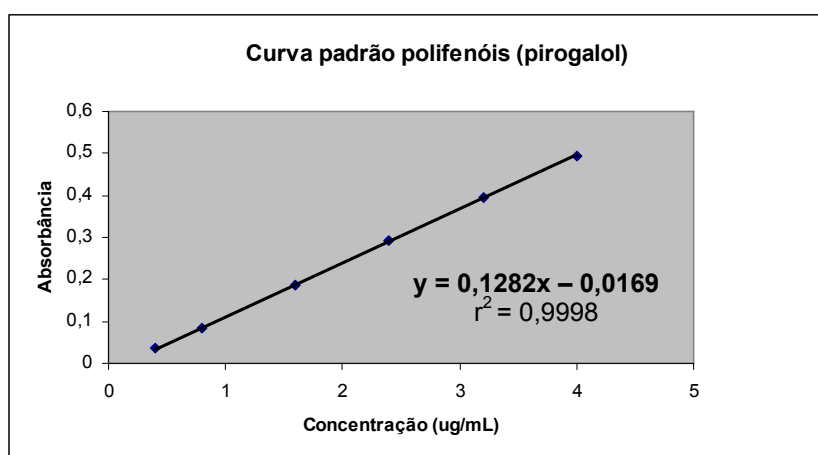
##### **4.4.1 Polifenóis totais**

###### **4.4.1.1 Curva de calibração para polifenóis totais**

A relação entre absorvância e concentração foi utilizada para a construção da curva de calibração a partir das soluções referência de pirogalol, em concentrações variando entre 0,4 e 4,0 µg/mL. Procedeu-se, então, à análise de

regressão linear, pelo método dos mínimos quadrados, obtendo-se a equação da reta e o coeficiente de correlação (Figura 9).

O valor do coeficiente de correlação obtido ( $r^2 = 0,9998$ ) indicou linearidade satisfatória entre as leituras de absorvância e as concentrações de pirogalol na faixa de 0,4 a 4,0  $\mu\text{g/mL}$ . Os valores de desvio-padrão relativo (DPR) para cada concentração foram inferiores a 0,50 %, evidenciando a precisão do método. A USP 23 recomenda valores máximos de DPR de 2,0%, para determinações espectrofotométricas (THE UNITED States pharmacopeia, 1995).



**Figura 9** - Curva de calibração para o pirogalol, obtida por espectrofotometria no visível em 720 nm.

#### **4.4.1.2 Quantificação de polifenóis totais na amostra**

A Tabela 11 apresenta os teores de polifenóis totais, expressos em pirogalol, para folhas e cascas das três espécies analisadas, com os respectivos desvios-padrão. Os valores apresentados correspondem aos teores percentuais de polifenóis totais das folhas e cascas das três espécies e cada medida refere-se à média de três determinações.

**Tabela 11** - Teor médio de polifenóis totais das folhas e cascas das espécies *Coutarea hexandra*, *Strychnos pseudoquina* e *Bathysa cuspidata* (percentual  $\pm$  desvio-padrão,  $n = 3$ ), expressos em pirogalol.

Amostras	Siglas	Abs. (X)	Teor (%p/p) expresso em teor de pirogalol <sup>#</sup>
<i>S. pseudoquina</i>	Folhas	SPF	0,067 $\pm$ 0,012
	Cascas	SPC	0,067 $\pm$ 0,014
<i>C. hexandra</i>	Folhas	CHF	0,269 $\pm$ 0,009
	Cascas	CHC	0,237 $\pm$ 0,003
<i>B. cuspidata</i>	Folhas	BCF	0,214 $\pm$ 0,020
	Cascas	BCC	0,284 $\pm$ 0,033

<sup>#</sup> As médias seguidas de pelo menos uma mesma letra na coluna não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Muitos relatos de propriedades benéficas para a saúde têm sido atribuídos aos metabólitos polifenólicos das plantas como antiviral, antimicrobiana, antiinflamatória e efeito anticoagulante humana (McGregor et al., 1999; Spignoli, 2000).

Os teores de polifenóis totais em folhas e cascas de *S. pseudoquina* foram significativamente inferiores aos teores encontrados para folhas e casca de *B. cuspidata* e *C. hexandra*. Na literatura não foram encontrados relatos específicos de quantificação de polifenóis para as espécies *S. pseudoquina*, *C. hexandra* e *B. cuspidata*.

Com base no tratamento estatístico pode-se inferir que para as espécies *S. pseudoquina* e *C. hexandra*, o teor de polifenóis totais não difere entre folhas e cascas, dentro de cada espécie. O mesmo não ocorre com as espécies *B. cuspidata*, pois ocorre variação no teor de polifenóis em relação às folhas e cascas. Os maiores valores encontrados foram para as folhas e cascas de *C. hexandra* e a casca de *B. cuspidata* e estas não diferem em seus valores entre si.

O alto teor de polifenóis nas cascas de *B. cuspidata* pode explicar o uso popular dessa droga vegetal, na forma de pó seco, sobre feridas da pele, visando a cicatrização. Tal fato pode ser explicado pela presença de taninos.

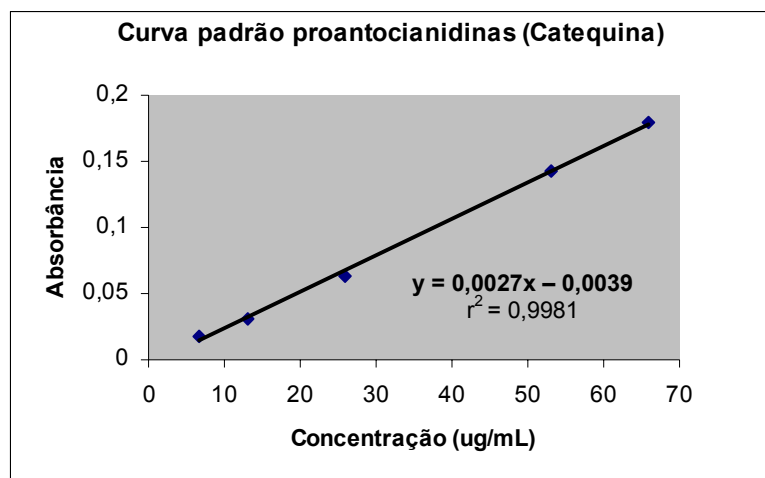
#### **4.4.2 Proantocianidinas**

##### **4.4.2.1 Curva de calibração para proantocianidinas**

Os teores de proantocianidinas nas cascas e folhas das três espécies estudadas foram determinados por espectrofotometria na região do visível a 500 nm.

Para a construção da curva de calibração utilizaram-se soluções de catequina, no intervalo de concentrações de 6,6 a 66 µg/mL, procedendo-se à leitura das absorvâncias a 500 nm. Os dados obtidos foram utilizados para construção da curva de calibração, procedendo-se à análise de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados (Figura 10).

O valor do coeficiente de correlação obtido ( $r^2 = 0,9931$ ) indicou linearidade satisfatória entre as leituras de absorvância e as concentrações de catequina na faixa utilizada. Os valores encontrados para DPR foram inferiores a 0,50 %, indicando a precisão do método. A USP 23 recomenda valores máximos de DPR de 2,0%, para determinações espectrofotométricas (THE UNITED States pharmacopeia, 1995).



**Figura 10** – Curva de calibração para a catequina, obtida por espectrofotometria no visível em 500 nm.

#### 4.4.2.2 Quantificação de proantocianidinas nas amostras

Na Tabela 12 estão dispostos os teores percentuais de proantocianidinas, expressos em catequina, seguido dos desvios-padrão, para as amostras de extratos etanólicos de cascas e folhas das três espécies. Estes resultados correspondem à média de três determinações.

**Tabela 12** - Teor de proantocianidinas de cascas e folhas das espécies *Coutarea hexandra*, *Strychnos pseudoquina* e *Bathysa cuspidata*, expressos em catequinas.

Amostras		Siglas	Abs. (X)	Teor (%p/p) expresso em teor de catequinas <sup>#</sup>
<i>S. pseudoquina</i>	Folhas	SPF	0,018 ± 0,002	1,27 <sup>c</sup>
	Cascas	SPC	0,019 ± 0,007	1,34 <sup>c</sup>
<i>C. hexandra</i>	Folhas	CHF	0,027 ± 0,002	1,81 <sup>c</sup>
	Cascas	CHC	0,049 ± 0,001	3,01 <sup>b</sup>
<i>B. cuspidata</i>	Folhas	BCF	0,045 ± 0,004	2,79 <sup>b</sup>
	Cascas	BCC	0,063 ± 0,005	3,79 <sup>a</sup>

<sup>#</sup> As médias seguidas de pelo menos uma mesma letra na coluna não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Mais recentemente, as proantocianidinas têm atraído interesses pelas suas propriedades antioxidantes (Ricardo et al., 1991; Ursini et al., 2001).

Na literatura não foram encontrados relatos específicos de quantificação de proantocianidinas para as três espécies de quina em análise.

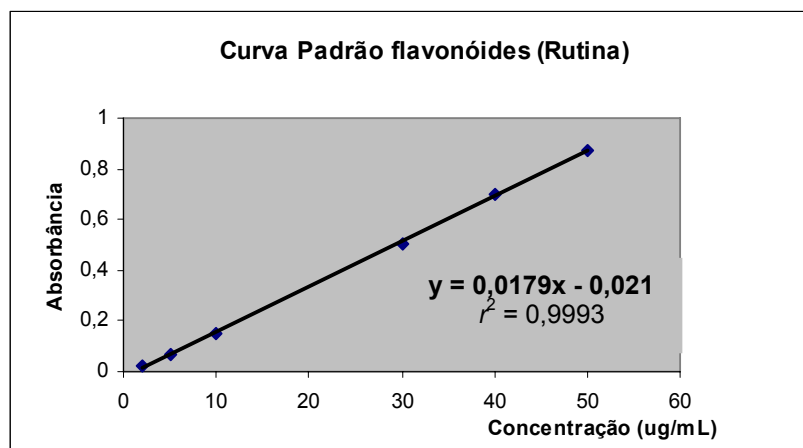
Com base no tratamento estatístico podemos inferir que entre as folhas e cascas da espécie *S. pseudoquina*, os teores de proantocianidinas não diferem entre si. O mesmo não ocorre com as espécies *B. cuspidata* e *C. hexandra*, pois ocorre variação no conteúdo, para a mesma classe de metabólitos, entre as folhas e cascas. O maior valor de proantocianidina encontrado foi para as cascas de *B. cuspidata*. Como para a quantificação de polifenóis totais o teor também foi elevado para essa droga vegetal (5,87%), pode-se agora concluir que a maior parte desses compostos polifenólicos são representados pelas proantocianidinas.

### **4.4.3 Flavonóides**

#### **4.4.3.1 Curva de calibração para flavonóides**

A quantificação de flavonóides totais nas cascas e folhas das três espécies analisadas foi realizada por espectrofotometria no visível.

Construiu-se a curva de calibração com soluções de rutina na faixa de concentrações de 2,0 a 50,0 µg/mL, procedendo-se à leitura das absorvâncias correspondentes, a 420 nm. Esses dados foram utilizados para construção da curva de calibração, procedendo-se à análise de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados (Figura 11).



**Figura 11** – Curva de calibração para a rutina utilizada para a determinação espectrofotométrica de flavonóides totais, a 420 nm.

O valor do coeficiente de correlação obtido ( $r^2 = 0,9993$ ) indicou linearidade satisfatória, na faixa de 2,0 a 50,0  $\mu\text{g/mL}$  de rutina. Os valores encontrados para DPR foram inferiores a 0,50%, indicando a precisão do método. A USP 23 recomenda valores máximos de DPR de 2,0%, para determinações espectrofotométricas (THE UNITED States pharmacopeia, 1995).

#### **4.4.3.2 Quantificação de flavonóides totais**

A Tabela 13 apresenta os teores de flavonóides totais, expressos em rutina, e os respectivos desvios-padrão, nas cascas e folhas das três espécies.

Os flavonóides são reconhecidos por sua atividade antioxidante, antibacteriana, antiinflamatória, antialérgica, antiviral, anticarcinogênica e hepatoprotetora (Middleton et al., 2000).

**Tabela 13** - Teor de flavonóides totais nas cascas e folhas das espécies *Coutarea hexandra*, *Strychnos pseudoquina* e *Bathysa cuspidata* (percentual  $\pm$  desvio-padrão), expressos em rutina.

Amostras		Siglas	Abs. (X)	Teor (%p/p) expresso em teor de rutina <sup>#</sup>
<i>S. pseudoquina</i>	Folhas	SPF	0,200 $\pm$ 0,087	0,80 <sup>b</sup>
	Cascas	SPC	0,849 $\pm$ 0,217	3,06 <sup>a</sup>
<i>C. hexandra</i>	Folhas	CHF	0,231 $\pm$ 0,022	0,91 <sup>b</sup>
	Cascas	CHC	0,077 $\pm$ 0,010	0,37 <sup>b</sup>
<i>B. cuspidata</i>	Folhas	BCF	0,143 $\pm$ 0,072	0,60 <sup>b</sup>
	Cascas	BCC	0,067 $\pm$ 0,010	0,34 <sup>b</sup>

<sup>#</sup> As médias seguidas de pelo menos uma mesma letra na coluna não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Com base no tratamento estatístico pode-se inferir que entre as folhas e cascas da espécie *C. hexandra* e *B. cuspidata* e folha de *S. pseudoquina* não diferem entre si no que diz respeito ao conteúdo de flavonóides. Para a casca de *S. pseudoquina* foi encontrado o maior valor e este difere de todos os outros valores encontrados para flavonóides. Esse resultado, analisado juntamente com o perfil cromatográfico por CLAE, com absorção em luz UV na região de 254nm (Fig. 8e), obtido para as cascas de *S. pseudoquina*, o qual apresentou um pico majoritário em 10,6 min, sugere que o extrato apresenta alto teor de um composto flavonoídico, ainda desconhecido. Pesquisas fitoquímica de isolamento e elucidação estrutural deverão ser conduzidas para a descoberta desse produto natural. Na literatura não foram encontrados relatos específicos de quantificação de flavonóides para as três espécies de quina em análise.

## 4.5 Mutagenicidade

Nos dias atuais, cerca de 65% da população mundial faz uso de plantas em seus tratamentos medicinais (Elgorashi et al., 2003). No Brasil, essa realidade não é diferente, principalmente devido à riqueza de espécies vegetais disponíveis nas diferentes regiões do país. No entanto, apesar da utilização de plantas medicinais no tratamento das mais diversas doenças ser uma prática bastante antiga e comum na população brasileira, seu consumo pode constituir um risco, pois as plantas sintetizam, através de seu metabolismo secundário, uma grande quantidade de compostos tóxicos, aparentemente como uma importante defesa contra predadores.

Estudos toxicológicos têm sido realizados com apenas uma pequena porcentagem destes compostos químicos (Cassady et al., 1990), e, dessa forma, os efeitos adversos das plantas mais comumente utilizadas pelo homem são pouco conhecido (Elgorashi et al., 2003). A literatura descreve vários estudos envolvendo plantas medicinais, sendo que vários deles têm demonstrado que produtos delas derivados podem apresentar atividade mutagênica *in vitro* e *in vivo* (Higashimoto et al., 1993; Sohni et al., 1994; Kassie et al., 1996). Estes efeitos demonstram a importância de estudos de toxicidade e de mutagenicidade das plantas comumente utilizadas pela população brasileira.

### 4.5.1 Avaliação da atividade mutagênica de folhas e cascas de *C. hexandra*

Para avaliação da mutagenicidade *in vitro* da espécie *C. hexandra* das folhas e cascas foram utilizadas cinco diferentes concentrações do extrato etanólico obtido desta planta para duas linhagens de *S. typhimurium* TA100 e TA98 (Tabela 14). Pode ser observado que não houve relação linear entre as doses testadas e o número de colônias revertentes tanto para a folha quanto para a casca e não houve diferença estatisticamente significativa entre o controle negativo e as doses testadas para a folha.

Para a casca houve diferença estatística significativa entre o grupo tratado e o controle negativo, indicando possível atividade mutagênica. Pela razão de mutagenicidade (RM) nenhuma das doses testadas, tanto para a folha quanto para a casca, apresentou índice maior ou igual a 2.

**Tabela 14** - Atividade mutagênica expressa pela média do número de revertentes, desvio padrão e razão de mutagenicidade (valor entre parênteses) nas linhagens TA98 e TA100 de *Salmonella typhimurium* expostas a diferentes concentrações dos extratos etanólicos de folhas e cascas de *Coutarea hexandra*.

Tratamento (mg/placa)	TA98		TA100	
	Folha	Casca	Folha	Casca
DMSO	31,6 ± 0,5		147,0 ± 6,2	
Ctrol +	96,6 ± 11,5 <sup>a</sup>		1110,6 ± 107,4 <sup>b</sup>	
2,06	35,3 ± 3,2(1,1)*	37,3 ± 4,7(1,2)*	148,0 ± 8,0(1,0)*	166,6 ± 12,8(1,1)*
4,12	35,3 ± 7,0(1,1)*	41,6 ± 7,5(1,3)*	166,6 ± 41,6(1,1)*	174,6 ± 18,0(1,2)*
8,25	42,6 ± 4,1(1,3)*	37,6 ± 5,5(1,2)*	185,6 ± 3,2(1,3)*	147,0 ± 6,5(1,0)*
12,37	33,3 ± 1,1(1,0)*	53,6 ± 1,5(1,7)*	174,0 ± 7,9(1,2)*	171,3 ± 5,6(1,2)*
16,50	33,6 ± 1,5(1,0)*	61,6 ± 3,7(1,9)*	185,3 ± 16,2(1,3)*	154,3 ± 3,2(1,0)*

Nota: DMSO: 100 µL/placa (controle negativo). Ctról + (Controle Positivo): a NPD (4-nitro-O-fenilenodiamino – 2,5 µg/placa); b Azida sódica (1,25 µg/placa); \*P <0,01.

Então, a partir desses resultados, podemos verificar que os extratos etanólicos de folhas e cascas desta espécie não apresentaram mutagenicidade e nem citotoxicidade em nenhuma das doses testadas para nenhuma das linhagens utilizadas. Mas como o extrato da casca apresentou diferença estatística em relação ao controle negativo e linearidade entre as doses testadas, este pode ser considerado como causador de indícios de mutagenicidade. Isto significa que esta amostra pode conter compostos capazes de causar danos ao DNA.

#### **4.5.2 Avaliação da atividade mutagênica de folhas e cascas de *S. pseudoquina***

Para avaliação da mutagenicidade *in vitro* da espécie *S. pseudoquina*, folhas e cascas, foram utilizadas cinco diferentes concentrações do extrato etanólico obtido desta planta para duas linhagens de *S. typhimurium* TA100 e TA98 (Tabela 15). O extrato da folha apresentou mutagenicidade nas doses avaliadas para as duas linhagens testadas, mas o extrato da casca não apresentou nas mesmas doses testadas, porém, foi citotóxico para a linhagem TA100, sem ativação metabólica. Isto quer dizer que ocorreu morte celular bacteriana devido à toxicidade das doses testadas, indicando um menor número de colônia revertentes em relação ao controle negativo. Desde modo, foram testadas novas doses para o extrato etanólico da casca desta espécie (Tabela 16). Para a folha desta espécie pode-se observar uma relação linear entre as doses testadas e o número de colônias revertentes, mas não houve diferença estatisticamente significativa entre o controle negativo e as doses testadas. Pela razão de mutagenicidade (RM) as doses testadas apresentaram índice maior ou igual a 2. Já para a casca, testada com doses menores, pode ser observado que não houve relação linear entre as doses testadas e o número de colônias revertentes e não houve diferença estatisticamente significativa entre o controle negativo e as doses testadas. Pela razão de mutagenicidade (RM) nenhuma das doses testadas apresentou índice maior ou igual a 2.

**Tabela 15** - Atividade mutagênica expressa pela média do número de revertentes, desvio padrão e razão de mutagenicidade (valor entre parênteses) nas linhagens TA98 e TA100 de *Salmonella typhimurium* expostas a diferentes concentrações dos extratos etanólicos de folha e casca de *Strychnos pseudoquina*.

Tratamento (mg/placa)	TA98		TA100	
	Folha	Casca	Folha	Casca
DMSO	21,3 ± 9,4		131,0 ± 1,7	
Ctrol +	119,3 ± 3,8 <sup>a</sup>		1304,0 ± 125,7 <sup>b</sup>	
3,33	40,0 ± 4,6(1,8)*	-	142,3 ± 3,0(1,1)*	142,0 ± 9,6
6,66	44,3 ± 5,0(2,0)*	-	174,3 ± 7,6(1,3)*	Citotóxico
13,30	46,0 ± 5,2(2,1)*	-	178,6 ± 9,8(1,4)*	Citotóxico
19,95	58,0 ± 2,0(2,7)*	-	212,0 ± 20,1(1,6)*	Citotóxico
26,60	73,0 ± 3,0(3,4)*	-	269,6 ± 6,4(2,1)*	Citotóxico

Nota: DMSO: 100 µL/placa (controle negativo). Ctról + (Controle Positivo): a NPD (4-nitro-O-fenilenodiamino – 2,5 µg/placa); b Azida sódica (1,25 µg/placa); \*P <0,01. A coluna com traços “-” indica que nestas doses utilizadas não foi realizado o teste de Ames para a linhagem TA98.

Podemos verificar, a partir desses resultados, que o extrato etanólico da folha de *S. pseudoquina* apresentou mutagenicidade nas linhagens utilizadas. No extrato etanólico da casca não foi verificada atividade mutagênica, mas apresentou citotoxicidade em doses elevadas. No entanto, em doses menores não apresentou mutagenicidade e citotoxicidade. O resultado sugere cautela na utilização do extrato de folhas e cascas de *S. pseudoquina*, pois o uso prolongado pode levar a danos ao organismo e ao DNA.

**Tabela 16** - Atividade mutagênica expressa pela média do número de revertentes, desvio padrão e razão de mutagenicidade (valor entre parênteses) nas linhagens TA98 e TA100 de *Salmonella typhimurium* expostas a diferentes concentrações do extrato etanólico da casca de *Sthychnos pseudoquina*.

Tratamento (mg/placa)	TA98	TA100
DMSO	30,3 ± 3,0	158,6 ± 9,6
Ctrol +	91,6 ± 7,2 <sup>a</sup>	1397,3 ± 55,1 <sup>b</sup>
0,42	32,0 ± 3,0(1,0)*	175,0 ± 3,6(1,1)*
0,83	28,0 ± 7,2(0,9)*	179,0 ± 6,5(1,1)*
1,66	30,6 ± 8,1(1,0)*	172,6 ± 1,5(1,0)*
2,49	32,0 ± 3,4(1,0)*	183,6 ± 4,5(1,2)*
3,33	35,0 ± 4,0(1,1)*	170,6 ± 16,2(1,0)*

Nota: DMSO: 100 µL/placa (controle negativo). Ctról + (Controle Positivo): a NPD (4-nitro-phenilenediamina – 2,5 µg/placa); b Azida Sódica (1,25 µg/placa); \*P <0,01.

#### 4.5.3 Avaliação da atividade mutagênica de folhas e cascas de *B. cuspidata*

Para avaliação da mutagenicidade *in vitro* da espécie *B. cuspidata* das folhas e cascas foram utilizadas cinco diferentes concentrações do extrato etanólico obtido desta planta para duas linhagens de *S. typhimurium* TA100 e TA98 (Tabela 17). Pode ser observado que não houve relação linear entre as doses testadas e o número de colônias revertentes e não houve diferença estatisticamente significativa entre o controle negativo e as doses testadas. Pela razão de mutagenicidade (RM) nenhuma das doses testadas apresentou índice maior ou igual a 2.

**Tabela 17** - Atividade mutagênica expressa pela média do número de revertentes, desvio padrão e razão de mutagenicidade (valor entre parênteses) nas linhagens TA98 e TA100 de *Salmonella typhimurium* expostas a diferentes concentrações dos extratos etanólicos de folhas e cascas de *B. cuspidata*.

Tratamento (mg/placa)	TA98		TA100	
	Folha	Casca	Folha	Casca
DMSO	28,0 ± 3,4		125,3 ± 6,0	
Ctrol +	161,3 ± 52,1 <sup>a</sup>		1296,0 ± 62,4 <sup>b</sup>	
0,51	38,6 ± 9,5(1,4)*	28,0 ± 3,4(1,1)*	153,3 ± 9,8(1,2)*	162,0 ± 17,3(1,3)*
1,03	44,0 ± 7,8(1,6)*	44,0 ± 1,7 (1,6)*	162,0 ± 6,0(1,3)*	202,0 ± 7,9(1,6)*
2,06	31,0 ± 5,2(1,1)*	38,6 ± 9,(1,2)*	196,0 ± 1,7(1,5)*	180,3 ± 4,0(1,4)*
3,09	39,0 ± 5,5(1,4)*	44,0 ± 7,8(1,0)*	193,6 ± 15,8(1,5*)	229,6 ± 12,7(1,8)*
4,12	36,0 ± 8,5(1,3)*	31,0 ± 5,2(1,2)*	183,0 ± 3,6(1,4)*	181,3 ± 17,3(1,4)*

Nota: DMSO: 100 µL/placa (controle negativo). Ctról + (Controle Positivo): a NPD (4-nitro-phenilenediamina – 2,5 µg/placa); b Azida Sódica (1,25 µg/placa); \*P <0,01.

Podemos verificar, a partir desses resultados, que os extratos etanólicos da casca e folha desta espécie não apresentaram mutagenicidade e nem citotoxicidade em nenhuma das linhagens utilizadas.

#### 4.5.4 Avaliação da atividade mutagênica dos alcalóides quinina e estricnina

Para avaliação da mutagenicidade *in vitro* dos alcalóides quinina e estricnina foram utilizados cinco diferentes concentrações do extrato etanólico obtido desta planta para duas linhagens de *S. typhimurium* TA100 e TA98 (Tabela 18). Pode ser observado que não houve relação linear entre as doses testadas e o número de colônias revertentes. Nas doses testadas, os alcalóides apresentaram citotoxicidade na linhagem TA 98, sem ativação metabólica. Desse modo, foram testadas novas doses para os alcalóides (Tabela 19).

**Tabela 18** - Atividade mutagênica expressa pela média do número de revertentes, desvio padrão e razão de mutagenicidade (valor entre parênteses) na linhagem TA98 de *Salmonella typhimurium* expostas a diferentes concentrações dos alcalóides quinina e estricnina.

Tratamento (mg/placa)	TA98	
	Quinina	Estricnina
DMSO	26,3 ± 3,78	
Ctrol +	132,0 ± 4,35 <sup>a</sup>	
0,037	31,0 ± 9,53(1,2)*	33,6 ± 7,37(1,3)*
0,075	25,0 ± 3,60(0,9)*	26,0 ± 6,24(1,0)*
0,150	35,0 ± 5,56(1,3)*	25,6 ± 4,50(1,0)*
0,225	citotóxico	citotóxico
0,300	28,0 ± 8,54(1,1)*	citotóxico

Nota: DMSO: 100 µL/placa (controle negativo). Ctról + (Controle Positivo): a NPD (4-nitro-phenilenediamina – 2,5 µg/placa); \*P <0,01.

**Tabela 19** - Atividade mutagênica expressa pela média do número de revertentes, desvio padrão e razão de mutagenicidade (valor entre parênteses) nas linhagens TA98 e TA100 de *Salmonella typhimurium* expostas a diferentes concentrações dos alcalóides quinina e estricnina.

Tratamento (mg/placa)	TA98		TA100	
	Quinina	Estricnina	Quinina	Estricnina
DMSO	29,0 ± 7,00		113,6 ± 8,02	
Ctrol +	233,3 ± 3,51 <sup>a</sup>		1341,3 ± 136,07 <sup>b</sup>	
0,51	35,0 ± 5,19(1,2)*	30,0 ± 3,00(1,0)*	143,0 ± 1,00(1,3)*	96,3 ± 9,01(0,8)*
1,03	32,0 ± 6,24(1,1)*	30,0 ± 1,73(1,0)*	190,0 ± 17,34(1,7)*	103,3 ± 14,15(0,9)*
2,06	34,6 ± 9,07(1,2)*	29,6 ± 3,51(1,0)*	166,3 ± 3,05(1,5)*	114,0 ± 25,15(1,0)*
3,09	30,0 ± 5,19(1,0)*	28,3 ± 3,78(0,9)*	121,3 ± 8,50(1,1)*	114,6 ± 10,69(1,0)*
4,12	30,3 ± 4,61(1,0)*	32,6 ± 5,03(1,1)*	121,3 ± 19,75(1,1)*	95,3 ± 7,23(0,8)*

Nota: DMSO: 100 µL/placa (controle negativo). Ctról + (Controle Positivo): a NPD (4-nitro-phenilenediamina – 5 µg/placa); b Azida Sódica (1,25 µg/placa); \*P <0,01.

Em com doses menores, pode ser observado que não houve relação linear entre as doses testadas e o número de colônias revertentes e não houve diferença estatisticamente significativa entre o controle negativo e as doses testadas. Pela razão de mutagenicidade (RM) nenhuma das doses testadas apresentou índice maior ou igual a 2 para ambos os alcalóides.

Para os alcalóides, quinina e estricnina, não foram verificadas atividades mutagênicas, mas apresentaram citotoxicidade em doses elevadas. Em doses menores não apresentou mutagenicidade e nem citotoxicidade. Isto demonstra que deve haver cautela na utilização destes alcalóides, pois o uso prolongado pode levar a danos para o organismo.

#### ***4.5.5 Resultados de mutagenicidade e metabolismo secundário***

De acordo com os estudos fitoquímicos realizados neste trabalho, foram identificados nos extratos avaliados, triterpenos e esteróides, flavonóides e taninos tanto nas cascas, como nas folhas das três espécies. Já a presença de cumarinas e alcalóides foram evidenciados apenas nas cascas. Esse fato pode ser responsável pelos diferentes resultados encontrados para a atividade mutagênica. Sabe-se que cada classe de metabólito pode possuir tanto atividade benéfica quanto prejudicial à saúde humana.

Os taninos são descritos na literatura como compostos capazes de apresentar atividades antimutagênica (Dauer et al., 2003), antioxidante (Haslam, 1996), antitumoral (Saleem et al., 2002), dentre outras. Entretanto, esses polifenóis, da mesma forma que os flavonóides, apresentam potencial pro-oxidante (Labieniec et al., 2003). De acordo com esses autores, os taninos, na presença de íons metálicos, deixam de ser antioxidantes e se tornam pro-oxidantes, citotóxicos e genotóxicos. Um outro estudo demonstrou a atividade genotóxica de taninos em células de mamíferos, causando quebras de fita simples, detectadas através do teste do cometa (Labieniec et al., 2003).

Segundo Yamakoshi et al. (2002), uma fração enriquecida de proantrocianidinas, obtido das sementes de uvas, não apresentou efeitos

mutagênicos pelos testes de Ames, de Aberração cromossômica *in vitro* e do Micronúcleo em células de camundongos. Por outro lado, de acordo com Dauer et al. (2003), uma fração de proantocianidinas obtida de *Hamamelis virginiana* causou quebras da molécula de DNA de hepatócitos, as quais foram detectadas através do teste do cometa. Porém, segundo este mesmo trabalho, essa fração de taninos apresentou também atividade antigenotóxica *in vitro*.

Não foram encontrados estudos que creditassem atividade genotóxica aos triterpenóides. Por outro lado, vários trabalhos revelam atividades biológicas bastante promissoras para esses compostos como antimutagenicidade (Resende et al., 2006) e atividade antitumoral (Fukuda et al., 2006).

O extrato metanólico de *Stevia pilosa* e *Stevia eupatoria* pode ser não somente um bom recurso alimentar natural, mas também um protetor contra mutagenicidade induzida por mutágenos que alteram o quadro de leitura ou alquilantes. A avaliação dos constituintes destes extratos sugere que luteolina e quercetina, provavelmente agem em sinergismo, podendo explicar as observações evidenciadas. Pesquisas recentes têm revelado que estes componentes têm forte potencial antimutagênica e antioxidante ou estão envolvidos em atividade anticarcinogênicas (Horvathova et al., 2003; Horvathova et al., 2004; Manju et al., 2005; Samy et al., 2006; Farombi; Onyema, 2006; Zhang et al., 2006).

Os flavonóides, outra classe de metabólitos secundários, são reconhecidos por sua atividade antioxidante (Rice-Evans, 2001; Heim et al., 2002; Soobrattee et al., 2005), a qual vem sendo relacionada a outros efeitos benéficos: atividades antibacteriana, antiinflamatória, antialérgica, antiviral, anticarcinogênica e hepatoprotetora (Middleton et al., 2000). Conforme afirmado anteriormente, a atividade antioxidante dos flavonóides está diretamente relacionada à sua estrutura química, sendo um elemento bastante relevante a quantidade de hidroxilas presentes na molécula, dentre outros fatores.

Porém, apesar desses compostos terem uma atividade antioxidante bastante significativa, vários estudos vêm creditando atividades pro-oxidantes e mutagênicas aos flavonóides (Rueff et al., 1992; Silva et al., 2002; Rietjens et al., 2005). Da mesma forma que a atividade antioxidante, os danos ocasionados por

esses compostos são relacionados com a estrutura química e os elementos presentes na molécula.

Quanto aos alcalóides, muitos desses compostos são reconhecidos por sua genotoxicidade (Wang; Peng, 1996; Mei et al., 2004, 2005; Ansah et al., 2005), porém, vários deles já demonstraram um potencial farmacológico muito proeminente, apresentando atividade antimicrobiana, antiplasmodial e antitumoral (Kingston et al., 1978; Frederich et al., 1999). Alcalóides tal como vincristina e vimblastina são descritos por serem responsáveis em aberrações cromossômicas observadas em extrato aquoso de *Borreria filiformis* e *Vinca rosea* (Ene; Osuala, 1990). A espécie *Piper sanctum* contém muitos alcalóides aporfirínicos bioativos, cavapirones e piperolidas com conhecido efeito no sistema nervoso central, sendo também citotóxico (Mata et al., 2004).

Pelos resultados obtidos para os alcalóides quinina, presente em plantas do tipo “quina”, e estricnina, presente em plantas do gênero *Strychnos*, pode-se perceber que estes não apresentam potencial de mutagenicidade mas citotoxicidade em doses mais elevadas. Deste modo devem-se tomar maiores precauções na utilização destes alcalóides.

Tendo em vista essas informações, pode-se inferir que mesmo a presença de compostos com potencial mutagênico na composição química dos extratos vegetais, os extratos etanólicos das cascas e folhas de *C. hexandra* e *B. cuspidata* não ocasiona uma mutagenicidade efetiva no teste realizado, mas a casca da espécie *C. hexandra* apresentou-se com indícios de mutagenicidade por análise estatística. Provavelmente, a interação entre esses compostos presentes no extrato é fundamental para que esse potencial se expresse concretamente ou não. Análises mais aprofundadas deverão ser realizadas para a confirmação destes resultados, levando a uma maior segurança para a população. Como a população utiliza a casca nos preparados medicinais e o resultado de mutagenicidade revelou ausência de atividade tanto na casca como na folha destas espécies, faz-se necessário confirmar se as folhas possuem as mesmas atividades farmacológicas das cascas.

Já o extrato etanólico da folha de *S. pseudoquina* ocasionou uma mutagenicidade efetiva no teste realizado para as linhagens TA98 e TA100 sem ativação metabólica, como já havia sido verificado por Santos et al., 2006b. No extrato da casca desta mesma espécie não foi verificado mutagenicidade efetiva no teste realizado, mas apresentou citotoxicidade em doses elevadas. Esta citotoxicidade provavelmente se deve a composição química do extrato vegetal. Com estes resultados é necessário que se tenha maior cuidado na utilização desta espécie no tratamento de doenças tanto para a casca quanto, principalmente, para a folha.

Por tudo que foi descrito e discutido até esse ponto, podemos verificar que a compreensão dos efeitos de um tratamento com extratos vegetais é algo muito complexo. Não se trata apenas de saber que efeito individual cada composto ou classe de compostos apresenta. É necessário levar em consideração que esses compostos interagem entre si e com o sistema biológico no qual são realizados os ensaios.

## 5. CONCLUSÃO

De acordo com os dados reunidos nesse trabalho podemos concluir que:

- A prospecção fitoquímica por CCD dos extratos etanólicos das cascas e folhas das espécies popularmente conhecidas como quina, *C. hexandra*, *B. cuspidata* e *S. pseudoquina*, apresentaram composição semelhante quanto a classes de metabólitos secundários. Para as três espécies analisadas observou-se uma diferença entre as classes de metabólitos secundários entre as cascas e as folhas dentro das mesmas, sendo que nas cascas soma-se a presença de cumarinas e alcalóides, inexistentes nas folhas.
- Os perfis cromatográficos obtidos por CLAE-FR dos extratos de cascas e folhas das três espécies constituem uma contribuição para a identificação desses extratos com fins ao controle de qualidade de amostras comercializadas como quina. A impressão digital por CLAE contribui, também, para futura padronização e utilização desses extratos no desenvolvimento de produtos farmacêuticos.
- Na quantificação de polifenóis, proantocianidinas e flavonóides foi observada uma variação significativa entre os teores desses metabólitos nos extratos analisados. O extrato das cascas de *B. cuspidata* se destacou entre os demais pelo maior teor de proantocianidinas (3,79%), tendo o conteúdo de polifenóis (5,87%) apenas comparado com as folhas de *C. hexandra*. As folhas de *S. pseudoquina* apresentaram teor de flavonóides (3,06%) significativamente superior aos demais extratos.
- Os extratos etanólicos das cascas e folhas das espécies *B. cuspidata* e *C. hexandra* não apresentaram efeitos mutagênicos *in vitro*. Já a folha de *S. pseudoquina* apresentou ação mutagênico *in vitro*, ocasionando mutações pontuais no DNA de *S. typhimurium*. Para essa mesma espécie, o extrato das cascas apresentou citotoxicidade em altas doses. Os compostos fenólicos (flavonóides e taninos) podem ter um papel relevante na mutagenicidade do extrato das folhas de *S. pseudoquina*.

- Apesar de vários alcalóides apresentarem alta toxicidade, os testes de mutagenicidade dos alcalóides quinina e estricnina foram negativos para as linhagens TA98 e TA100, sem ativação metabólica. No entanto, esses alcalóides apresentaram citotoxicidade em doses mais elevadas.
- Quanto ao uso popular de *S. pseudoquina*, *C. hexandra* e *B. cuspidata*, o fato de haver emprego das cascas das respectivas espécies e tal farmacógenos não terem evidenciado mutagenicidade no teste de Ames, sem ativação metabólica, até o momento, não existem evidências que levem à proscrição dessas drogas vegetais. Estudos empregando teste de Ames, com ativação metabólica, precisam ainda ser conduzidos para confirmação desse fato.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adlercreutz H. Phyto-oestrogens and cancer. *Lancet Oncology*, v. 3, p. 364–73, 2002 .

Albuquerque U.P. *Introdução à etnobotânica*. 2.ed. Rio de Janeiro: Editora Interciência, 2005.

Alonso, J.R. *Tratado de fitomedicina: bases clínicas Y farmacológicas*. Buenos Aires: Isis Ediciones S.R.L., 1998.

Alves, H.M. Plantas como fonte de fitofármacos. *Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola*, v. 3, 2001.

Alves R.M.S., Stehmann J.R., Isaias R.M.S., Brandão M.G.L. Caracterização botânica e química de *Rudgea viburnoides* (Cham.) Benth., (Rubiaceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 14, n. 1, jan-jun, 2004.

Ames B.N. Dietary carcinogens and anticarcinogens: oxygen radicals and degenerative diseases. *Science*, v. 221, n. 4617, p.1256-1264, 1983.

Andrade-Neto V.F., Brandão M.G.L., Stehmann J.R., Oliveira L.A., Krettli A.U. Antimalarial activity of Cinchona-like plants used to treat fever and malaria in Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 87, p. 253–256, 2003.

Andreassi M.G., Botto N., Colombo M.G., Biagini A., Clerico A. Genetic instability and atherosclerosis: can somatic mutations account for the development of cardiovascular diseases? *Environmental Molecular Mutagenic*, v. 35, p. 265–9, 2000.

Angenot L., Quertim-Leclercq J., Bisset N.G. South american Strychnos species. Ethnobotany (except curare) and alkaloid screening. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 28, p.1 - 52, 1990.

Ansah C., Khan A., Gooderham N.J. *In vitro* genotoxicity of the West African anti-malarial herbal *Cryptolepis sanguinolenta* and its major alkaloid cryptolepine. *Toxicology*, v. 208, p. 141–147, 2005.

Aprison M.H., Galvez-Ruano E., Lipkowitz K.B. Identification of a second glycine-like fragment on the strychnine molecule. *Journal of Neuroscience Research*, v. 40, p. 396–400, 1995.

Aprison M.H., Lipkowitz K.B., Simon J.R. Identification of a glycinelike fragment on the strychnine molecule. *Journal Neuroscience Research*, v. 17, p. 209–13, 1987.

Aquino R., Dagostino M., Desimone F., Pizza C. Plant metabolites - 10.4-aryl coumarin glycosides from *Coutarea hexandra*. *Phytochemistry*, v. 27, p. 1827-1830, 1988.

Aruoma O.I. Methodological considerations for characterizing potential antioxidante actions of bioactive components in plant foods. *Mutation Research*, v. 523, p.9-20, 2003.

Barbosa-Filho J.M., Vasconcelos T.H.C., Alencar A.A., Batista L.M., Oliveira R.A.G., Guedes D.N., Falcão H.S., Moura M.D., Diniz M.F.F.M., Modesto-Filho J. Plants and their active constituents from South, Central, and North América with hypoglycemic activity. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 15, p. 392-413, 2005.

Barroso, G.M., Peixoto, A.L., Costa C.G, Ichaso C.L.F., Guimarães E.F., Lima H.C. *Sistemática das Angiospermas do Brasil*, 3, Viçosa: Imprensa Universitária UFV., 326p, 1986.

Bassleer R., Depauw-Gillet M.C., Massart B., Marnette J.M., Wiliquet P., Caprasse M., Angenot L. Effets de trois alcaloïdes extraits du *Strychnos usambarensis* sur des cellules cancéreuses en culture. *Planta Medica*, v. 45, p.123–126, 1982.

Becker H.J. Mitotic recombination. The genetics and biology of *Drosophila*, p.1019-1087, 1986.

Bertani S., Bourdy G., Landau L., Robison J.C., Esterre P., Deharo E. Evaluation of French Guiana tradicional antimalarical remedies. *Journal of Ethnopharmacology*. v. 98, p.45-54, 2005.

Biswas S., Murugesan T., Maiti K., Ghosh L., Pal M., Saha B.P. Study on the diuretic activity of *Strychnos potatorum* Linn. seed extract in albino rats. *Phytomedicine*, v. 8, p. 469–471, 2001.

Bonjean K., De Pauw-Gillet M.C., Defresne M.P., Colson P., Houssier C., Dassonneville L., Bailly C., Greimers R., Wright C., Quetin-Leclercq J., Tits M., Angenot L. The DNA intercalating alkaloid cryptolepine interferes with topoisomerase II and inhibits primarily DNA synthesis in B16 melanoma cells. *Biochemistry*, v. 37, p. 5136–5146, 1998.

Borges A., Abrantes J., Teixeira M.T., Parada P. Strychnine. [www.inchem.org/documents/pims/chemical/pim507 htm](http://www.inchem.org/documents/pims/chemical/pim507.htm), 2006.

Botsaris A. S. Plants used traditionally to treat malaria in Brazil: the archives of Flora Medicinal. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, v. 3, p. 1-8, 2007.

Boye G.L., Ampofo O. Proceedings of the First International Symposium on Cryptolepine, Abstract No. 4, Kumasi, University of Science and Technology, Ghana, 1983.

Braga F.C., Valadares Y.M., Costa M.A., Lombardi J.A., Oliveira A.B. Estudo fitoquímico de *Erythraea centaurium*, *Jacaranda caroba*, *Remijia ferruginea* e *Solanum paniculatum* visando identificar marcadores químicos para o fitoterápico Ierobina®. *Revista Brasileira Farmacognosia*, v. 14, supl., p. 28-31, 2003.

Bruce-Chwatt L.J. Cinchona and its alkaloids: 350 years later. *New York State Journal of Medicine*, v. 88, p. 318–322, 1988.

Bruneton J. Farmacognosia, fitoquímica, plantas medicinales. 2. ed. Zaragoza, España: Acribia. 1100 p, 2001.

Calixto J.B., Scheidt C., Otuki M., Santos A.R.S. Biological activity of plant extracts: novem analgesic drugs. *Expert Opinion in Emerging Drugs*, v. 2, p. 261-279, 2001.

Calixto J.B. Fitoterápicos no Brasil: agora ou nunca! *Ciência hoje*, [S.l.], v. 21, n. 1234, p. 26-30, 1997.

Cariño-Cortés R., Hernández-Ceruelos A., Torres-Valencia J.M., González-Avila, M. Arriaga-Alba M., Madrigal-Bujaidar E.. Antimutagenicity of *Stevia pilosa* and *Stevia eupatoria* evaluated with the Ames test. *Toxicology in Vitro*, v.21, p.691–697, 2007.

Caron C., Hoizey M.J., Men-Olivier L., Massiot G., Zeches M., Choisy C., Le Magrex E., Verpoorte R. Antimicrobial and antifungal activities of quasi-dimeric and related alkaloids. *Planta Médica*, v. 54, p. 409–412, 1988.

Carvalho L.H., Brandão M.G.L., Santos-Filho D., Lopes J.L.C., Krettli A.U. Antimalarial activity of crude extracts from Brazilian plants studied in vivo in *Plasmodium berghei*-infected mice and in vitro against *Plasmodium falciparum* in culture. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 24, p. 1113– 1123, 1991.

Cassady J. M., Baird W. M., Chang C.J.. Natural products as a source of potential cancer chemotherapeutic and chemopreventive agents. *Journal of Natural Products*, v. 53, p. 23-41, 1990.

Chan Y.C. Strychnine. In: Goldfrank L.R., Flomenbaum M., Hoffman R.J., Howland M-A, Lewin N.A., Nelson L.S., eds. *Goldfrank's Toxicologic Emergencies*. 8th edn. New York: McGraw-Hill: 1492–6, 2002.

Corrêa M. P. *Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas (v. 1)*. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1926.

Corrêa M. P. *Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas* (v. 6). Rio de Janeiro: IBDF, 747 p., 1984.

Costa R.M.A., Menk C.F.M. Biomonitoramento de mutagênese ambiental. *Biotecnologia: ciência e desenvolvimento*, v. 3, n. 12, p. 24-26, 2000.

Cotten M.S., Lane D.H. Massive strychnine poisoning: a successful treatment. *Journal of the Mississippi State Medical Association*, v.7, p. 466–8, 1966.

Cronquist A. The evolution and classification of flowering plants. New York: The New York Botanical Garden, 555 p, 1988.

Cunha N.S. Uma perícia farmacognóstica e falsas quininas do Brasil. *Revista da Associação brasileira de farmacêuticos*, v. 18, n. 4, p. 156-168, 1937.

Cuzzocrea S., Riley P.D., Caputi P.A., Salvemini D. Antioxidant therapy: a new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia/reperfusion injury. *Pharmacological Review*, v. 53, p. 135–159, 2001.

D'agostino M., Defeo V., Desimone F., Pizza C. 4-Arylcoumarin from *Coutarea hexandra*. *Phytochemistry*, v. 28, p. 1773-1774, 1989a.

D'agostino M., Defeo V., Desimone F., Vincieri F.F., Pizza C. Isolation of 8-hydroxy-5,7,3',4'-tetramethoxy-4- phenylcoumarin from *Coutarea hexandra*. *Planta Médica*, v. 6, p. 578-578, 1989b.

D'agostino M., Desimone F., Dini A., Pizza C. Isolation of 8,3'-dihydroxy-5,7,4'-trimethoxy-4-phenylcoumarin from *Coutarea hexandra*. *Journal Natural Product*, v. 53, p. 161-162, 1990.

Dauer A., Hensel A., Lhoste E., Knasmüller S., Merschundermann. Genotoxic and antigenotoxic effects of catechin and tannins from the bark of *Hamamelis virginiana* L. In metabolically competent, human hepatoma cells (HEP G2) using single cell gel electrophoresis. *Phytochemistry*, v. 63, p. 199- 207, 2003.

De Flora S., Alberto I., Kurt R., Erika R., Helmut B., Jagadeesan N., Roumen B., Frederikjan van S., Paolo D., Gilberto F., Debra W., Joellen L. DNA adducts in chronic degenerative diseases. Pathogenic relevance and implications in preventive medicine. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, v. 366, p.197–238, 1996.

Delle-Monache F., Aldo P.T., Bettolo G.B.M. Occurrence of nor dihydrotoxiferine in *Strychnos pseudoquina* St. Hil. *Tetrahedron Letter*, v. 25, p. 2009-2012,1969.

Dellemonache G., Botta B., Neto A.S., Delima R.A. 4- Arylcoumarin from *Coutarea hexandra*. *Phytochemistry*, v. 22, p.1657-1658, 1983.

Dellemonache G., Botta B., Delima R.A. A 4-arylcoumarin from *Coutarea hexandra*. *Phytochemistry*, v. 23, p. 1813-1813, 1984.

Dellemonache G., Botta B., Vinciguerra V., Gacsbaitz E. A new neoflavonoid from *Coutarea hexandra*. *Heterocycles*, v. 29, p. 355-357, 1989.

Dellemonache G., Botta B., Vinciguerra V., Pinheiro R.M. Constituents of *Coutarea hexandra*. 6. 4- Arylcoumarins from *Coutarea hexandra*. *Phytochemistry*, v. 29, p. 3984-3986, 1990.

Demedeiros C.L.C., Thomas G., Mukherjee R. The source of Ca<sup>2+</sup> for the spasmolytic actions of longicaudatine. A bisindole alkaloid isolated from *Strychnos trinervis* (Vell) Mart (Loganiaceae). *Phytochemistry Research*, v. 5, p. 24–28, 1991.

Desmarchelier C., Lisboa Romão R., Coussio J., Ciccio G. Antioxidant and free radical scavenging activities in extracts from medicinal trees used in the 'Caatinga' region in northeastern Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 67, p. 69-77, 1999.

Disponível em < <http://www.bibliomed.com.br/lib/showdoc.cfm?LibCatID=1&Search=intoxica%E7%E3o+digital&CurrentPage=0&LibDocID=1146> > Acessado em 26 de setembro de 2008.

Disponível em < <http://pt.wikipedia.org/wiki/Quinina> > Acessado no dia 26 de setembro de 2008.

Disponível em < <http://pt.wikipedia.org/wiki/Murta-do-mato> > Acessado em 26 de janeiro de 2008.

Dixon R.A. Natural products and plant disease resistance. *Nature*, v. 411, p. 843–847, 2001.

Duarte M.C.T., Figueira G.M., Pereira B., Magalhães P.M., Delarmelina C. Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcoólicos de espécies da coleção de plantas medicinais CPQBA/UNICAMP. *Revista Brasileira Farmacognosia*, v. 14, suplemento 1, p. 6-8, 2004.

Duarte M.C.T., Leme E.E., Delarmelina C., Soares A.A., Figueira G.M., Sartoratto A. Activity of essential oils from Brazilian medicinal plants on *Escherichia coli*. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 11, p. 197-201, 2007.

Edenharder R., Sager W.J., Glatt H., Muckel E., Platt L.K. Protection by beverages, fruits, vegetables, herbs, and flavonoids against genotoxicity of 2-acetylaminofluorene and 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhPI) in metabolically competent V79 cells. *Mutation Research*, v. 521, p. 57–72, 2002.

Elbling L., Weiss R.M., Teufelhofer O., Uhi M., Knasmueller S., Schulte-Hermann R., Berger W., Mickshe M. Green tea extract and (-)-epigallocatechin-3-gallate, the major tea catechin, exert oxidant but lack antioxidant activities. *FASEB Journal*, v. 19, p. 248-437, 2005.

Eldin S., Dunford A. *Fitoterapia na atenção primária à saúde*. São Paulo, Manole, 163p, 2001.

Elgorashi E. E., Taylor J. L. S., Maes A., Staden J., Kimpe N., Verschaeves L. Screening of medicinal plant used in South African traditional medicine for genotoxic effects. *Toxicology Letters*, v. 143, p. 195-207, 2003.

Elisabetsky E., Amador T.A., Leal M.B., Nunes D.S., Carvalho A.C.T., Verotta L. Merging ethnopharmacology with chemotaxonomy: An approach to unveil bioactive natural products. The case of *Psychotria* alkaloids as potential analgesics. *Ciência e Cultura*, v. 49, n. 5-6, p. 378-385, 1997.

Ene E.E., Osuala C.L. The mutagenic potentials of water extracts of *Borreria filiformis* (Hiern) Hatch and Dalz. and *Vince rosea* Linn. *Nigerian Journal of Botany*, v. 3, p. 35-40, 1990.

Etkin N.L. Perspectives in ethnopharmacology: forging a closer link between bioscience and traditional empirical knowledge. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 76, p. 177- 182, 2001.

Fabricant T. S., Farnsworth N. R. The value of plant used in traditional medicine for drug discovery. *Environmental Health Perspectives*, v. 109, p. 69-75, 2001.

Farias M.R. Avaliação da qualidade de matérias-primas vegetais. p. 197-220. In: Simões, C.M.O. (ed.). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Florianópolis, Universidade Federal de Santa Catarina, 2001.

Farmacopéia Brasileira – 3ª Edição. ISBN: 8574760684. Ministério da Saúde. Editora Andrei, 2007.

Farnsworth N.R. Ethnopharmacology and drug development. *Ciba Found Symp*, v. 185, p. 42-51:discussion 51-59, 1994.

Farnsworth N. R., Akerele O., Bingel A.S., Soejarto D.D., GUO Z. Medicinal plants in therapy. *Bulletin of the World Health Organization*; v. 63, n.6, p. 965-81, 1985.

Farombi E.O., Onyema O.O. Monosodium glutamate-induced oxidative damage and genotoxicity in the rat: modulatory role of vitamin C, vitamin E and quercetin. *Human & Experimental Toxicology*, v. 25, p. 251-259, 2006.

Ferreira I.C.D.F., Vargas V.M.F. Mutagenicity of medicinal plant extracts in *Salmonella* microsome assay. *Phytochemistry Research*, v. 13(5), p. 397-400, 1999.

Ferreira E. I. Trends in the research for new antimalarial agents. *Revista Farm. Bioquím. Universidade de São Paulo*, São Paulo, vol. 29, n. 1 (jan/jun), p. 1-15, 1993.

Filho D.W., Da Silva E.L., Boveris A. Flavonóides antioxidantes de plantas medicinais e alimentos: importância e perspectivas terapêuticas. In: Yunes, R.A.; Calixto, J.B. *Plantas medicinais: sob a ótica da química medicinal moderna*. Chapecó: Agros, p. 317-334, 2001.

Filho P.G. Estudos Taxonômicos do gênero *Bathysa* C. Presl. (Rubiaceae, Rondeletieae), no Brasil. *Rodriguesia*, v. 50, p. 49-75, 1999.

Frederich M., Bentires-Alj M., Tits M., Angenot L., Greimers R., Gielen J., Bours V., Merville M.P.. Isostrychnopentamine, an indolomonoterpenic alkaloid from *Strychnos usambarensis*, induces cell cycle arrest and apoptosis in human colon cancer cells. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 304, p. 1103–1110, 2003.

Frederich M., Jacquier M.J., Thepenier P., De Mol P., Tits M., Philippe G., Delaude C., Angenot L., Zeches-Hanrot M. Antiplasmodial activity of alkaloids from various *Strychnos* species. *Journal of Natural Products*, v. 65, p.1381–1386, 2002.

Frederich M., Hayette M.P., Tits M., De Mol P., Angenot L. In vitro activities of *Strychnos* alkaloids and extracts against *Plasmodium falciparum*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, v. 43, p. 2328–2331, 1999.

Frei H., Würzler F.E. Optimal experimental design and sample size for the statistical evaluation of data from somatic mutation and recombination tests (SMART) *Drosophila*. *Mutation Research*, v. 334, p. 247-258, 1995.

Fukuda Y., Sakai K., Matsunaga S., Tokuda H., Tanaka R. Cancer chemopreventive effect of orally administrated lupane-type triterpenoid on ultraviolet light b induced photocarcinogenesis of hairless mouse. *Cancer Letters*, v. 240, p. 94-102, 2006.

Gosselin R.E., Smith R.P., Hodge H.C. *Clinical Toxicology of Commercial Products*. 5th edn. Baltimore/London: Williams & Wilkins: p.375–9, 1984.

Greene R., Meatherall R. Dermal exposure to strychnine. *Journal of Analytical Toxicology*, v. 25, p. 344–7, 2001.

Griffiths A.J.F., Miller J.H., Suzuki D.T., Lewontin R.C., Gelbart W.M. *Introdução à genética*. São Paulo. Guanabara-Koogan. 7ed. 794p. 2002.

Guerra P.M., Nodari O.R. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: Simões M.O. et al. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 3. ed. Porto Alegre: UFRGS; Florianópolis: UFSC, p. 15, 2001.

Haslam E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: Possible modes of action. *Journal of Natural Products*, v. 59, p. 205-215, 1996.

Heim K. E., Tagliaferro A. R., Bobilya D. J. Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry*, v. 13, p. 572–584, 2002.

Henriques J.A.P., Valsa J.O., Gomes R.A. Utilização de testes de microrganismos para detecção de atividade mutagênicas e/ou potencialmente mutagênicas. In: Pinto, S.O C.(ed) Genética molecular de microrganismos. São Paulo, Manole, p.330-350, 1987.

Higashimoto M., Purintrapiban J., Kataoka K., Kinouchi T., Vinitketkumnuen U., Akimoto S., Matsumoto H., Ohnishi Y. Mutagenicity and antimutagenicity of extracts of three species and a medicinal plant in Thailand. *Mutation Research*, v. 303, p. 135-142, 1993.

Hiruma-Lima C.A., Santos L.C., Kushima H., Pellizzon C.H., Silveira G.G., Vasconcelos P.C.P., Vilegas W., Souza Brito A.R.M. *Qualea grandiflora*, a Brazilian “Cerrado” medicinal plant presents an important antiulcer activity. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 104, p. 207-214, 2006.

Hoehne F.C. *Plantas e substâncias vegetais tóxicas e medicinais*. Graphicars. São Paulo. 335 p, 1939.

Horvathova K., Novotny L., Tothova D., Vachalkova A. Determination of free radical scavenging activity of quercetin, rutin, luteolin and apigenin in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated human ML cells K562. *Neoplasma*, v. 51, p. 395–399, 2004.

Horvathova K., Novotny L., Vachalkova A. The free radical scavenging mactivity of four flavonoids determined by the comet assay. *Neoplasma*, v. 50, p.291–295, 2003.

Hugget A.C., Schilter B., Roberfroid M., Antignac E., Koeman J.H. Comparative methods of toxicity testing. *Food Chemical Toxicology*, n. 34, p 183-192, 1996.

Igor M., Gal M., Azik H., Ophir S., Brosh-Nissimov T., Zeev T., Tsvika D., Arik E. Strychnine – A Killer from the Past. *Toxic Chemical Compounds*, v. 10, fev. 2008.

Iinuma M., Tanaka T., Hamada K., Mizuno M., Asai F., Reher G., Kraus L. Revised structure of neofl avone in *Coutarea hexandra*. *Phytochemistry*, v. 26, p. 3096-3097, 1987.

Ivizi L., Araujo G.M. Phenology of 14 tree species of a deciduous seasonal forest in Uberlandia, MG, central Brazil. *Arquivos de Biologia e Tecnologia*, v. 40, p. 883-892, 1997.

Jian Z.T., Davis, L.C., Verpoorte, R. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, v. 23, p. 283-333, 2005.

Jorge R.M., Leite J.P.V., Oliveira A.B., Tagliati C.A. Evaluation of antinociceptive, anti-inflammatory and antiulcerogenic activities of *Maytenus ilicifolia*. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 94, p. 93-100, 2004.

Jurado J., Alejandro-Duran E., Alonso-Moraga A., Pueyo C. Study on the mutagenic activity of 13 bioflavonoids with the *Salmonella* Ara test. *Mutagenesis*, v. 6, n.4, p. 289-295, 1991.

Kapoor V.K., Sharma S.K., Chagti K.K., Singh M. Synthesis and hypotensive activity of diaboline. *Indian J. Chem. Sect. B—Org. Chem. Incl. Med. Chem.*, v. 27, p. 641-644, 1988.

Karle J.M., Karle I.L., Gerena L., Milhous W.K. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, v. 36, p. 1538-1544, 1992.

Kassie F. P., Musk W., Johnson S., Lamprecht I., Sountag G., Knsmuller G.S. Genotoxic effects of crude juices from Brassica vegetables and juices and extracts from phytopharmaceuticals preparations and spices of cruciferous plants origin in bacterial and mammalian cells. *Chemical and Biological Interactions*, v. 27, p. 1-16, 1996.

Kaur S., Michael H., Arora S., Härkönen P.L., Kumar S. The in vitro cytotoxic and apoptotic activity of Triphala-an Indian herbal drug. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 97, p. 15-20, 2005.

Kingston D.G., Gerhart B.B., Ionescu F., Mangino M.M., Sami S.M. Plant anticancer agents V: new bisindole alkaloids from *Tabernaemontana johnstonii* stem bark. *Journal Pharmacology Science*. v. 67, n. 2, p. 249-251, 1978.

Kirby G.C., Paine A., Warhurst D.C., Noamesi B.K., Philipson J.D.. In vitro and in vivo anti-malarial activity of cryptolepine, a plant derived indoquinoline. *Phytochemistry Research*, v. 9, p. 359-363, 1995.

Konstantoupoulou I., Vassilopoulov L., Maviaganitsipido U., Scouras, Z.G. Insecticidal effects of essential oils. A study of the effects of essential oils extracted from eleven greek aromatic plants on *Drosophila auraria*. *Experientia*, v. 48, p. 616-9, 1992.

Krettli A.U., Andrade-Neto V.F., Brandão M.G.L., Ferrari W.M.S. The search for new antimalarial drugs from plants used to treat fever and malaria or plants randomly selected: a review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 96, p. 1033–1042, 2001.

Labieniec M., Gabryelak T., Falcioni G. Antioxidant and pro-oxidant effects of tannins in digestive cells of the freshwater mussel *unio tumidus*. *Mutation Research*, v. 539, p. 19-28, 2003.

Lamaison J.L.C., Carnet A. Teneurs en principaux flavonoides des fleurs de *Crataegus monogyna* Jacq et de *Crataegus laevigata* (Poiret D. C) en fonction de la vegetation. *Pharmaceut Acta Helve*, v. 65, p. 315–20, 1990.

Lambert J.R., Byrick R.J., Hammeke M.D. Management of acute strychnine poisoning. *Canadian Medical Association Journal*, v. 124, p. 1268–70, 1981.

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, p. 72-86, 2005.

Leite J.P.V. Desenvolvimento da Fitoterapia. In.: Fitoterapia: bases científicas e tecnológicas. São Paulo: Atheneu. Capítulo 1, p. 3-20, 2008a.

Leite J.P.V. Química de produtos naturais: uma abordagem biossintética. In.: Fitoterapia: bases científicas e tecnológicas. São Paulo: Atheneu. Capítulo 3, p. 47-98, 2008b.

Lewinsohn T.M., Prado P.I. *Biodiversidade brasileira: síntese do estado atual do conhecimento*. São Paulo: Contexto, 176p, 2002.

Lima M.R.F., Ximenes C.P.A., Luna J.S., Sant'Ana A.E.G. The antibiotic activity of some Brazilian medicinal plants. *Revista Brasileira Farmacognosia*, v.16, p. 300-306, 2006.

Lisgarten J.N., Coll M., Portugal J., Wright C.W., Aymami J. The antimalarial and cytotoxic drug cryptolepine intercalates into DNA at cytosine–cytosine sites. *Nature Structural Biology*, v. 9, p. 57–60, 2002.

Lucena J.E.X., Bispo M. D., Nunes R.S., Cavalcant S.C.H., Silva F.T., Marçal R.M., Antonioli A.R. Efeito antinociceptivo e antiinflamatório do extrato aquoso da entrecasca de *Coutarea hexandra* Schum. (Rubiaceae). *Revista Brasileira Farmacognosia*, v.16, n. 1, p. 67-72, 2006.

Mabberley D.J. *The plant-book: a portable dictionary of the vascular plants*. Cambridge University Press, Cambridge, 1997.

Maciel M.A.M., Pinto A.C., Veiga Jr V.F., Grynberg N.F. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. *Química Nova*, v. 25, p. 429-438, 2002.

Manju V., Balasubramaniyan V., Nalini N. Rat colonic lipid peroxidation and antioxidant status: the effects of dietary luteolin on 1,2- dimethylhydrazine challenge. *Cellular & Molecular Biology Letters*, v. 10, p. 535-551, 2005.

Maron D. M., Ames B. N. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutation Research*, May, v. 113(3-4), p. 173-215, 1983.

Mata R., Morales I., Perez O., Rivero-Cruz I., Acevedo L., Enriquez- Mendoza I., Bye R., Franzblau S., Timmermann B. Antimycobacterial compounds from *Piper sanctum*. *Journal of Natural Products*, v. 67, p. 1961-1968, 2004.

Mattijs K.J., Albert K., Herman J. W., Wim J. Q., Oliver K. Combinatorial biosynthesis of medicinal plant secondary metabolites. *Biomolecular Engineering*, v. 23, p. 265-279, 2006.

McDowell T., Volovsek M., Manos P. Biogeography of exostema (Rubiaceae) in the Caribbean region in light of molecular phylogenetic analyses. *Systematic Botany*, v. 28, p. 431-441, 2003.

McGregor L., Bellangeon M., Chignier E., Lerond L., Rouselle C., McGregor J.L. Effect of a micronized purified flavonoid fraction on in vivo platelet functions in the rat. *Thrombosis Research*, v. 94, p. 235-40, 1999.

Mei N., Guo L., Fu P.P., Heflich R.H., Chen T. Mutagenicity of comfrey (*Symphytum officinale*) in rat liver. *British Journal of Cancer*, v. 92, p. 873-5, 2005.

Mei N., Heflich R.H., Chou M.W., Chen T. Mutations induced by the carcinogenic pyrrolizidine alkaloid riddelliine in the liver cell gene of transgenic big blue rats. *Chemical Research Toxicology*, v. 17, p. 814-818, 2004.

Melo J.G., Martins J.D.G.R., Amorim E.L.C., Albuquerque U.P. Qualidade de produtos a base de plantas medicinais comercializados no Brasil: castanha-da-índia (*Aesculus hippocastanum* L.), capim-limão (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf e centela (*Centella asiatica* (L.) Urban). *Acta botanica brasílica*, v. 21, n.1, p. 27-36, 2007.

Mendonça V.G., Bara M.T.F., Rezende M.H., Ferreira H.D., Paula, J.R. Estudo farmacognóstico das folhas de *Strychnos pseudoquina* A. ST.-HILL. *Revista Eletrônica de Farmácia*, Suplemento v. IV (2), p.137-139, 2007.

Mendonça-Filho R.F.W., Menezes F.S. Estudo da utilização de plantas medicinais pela população da Ilha Grande- RJ. *Revista Brasileira Farmacognosia*, v. 13(Supl): p. 55-58, 2003.

Mengue S. S., Mentz L.A., Shenkel E.P. Uso de plantas medicinais na gravidez. *Revista Brasileira Farmacognosia*, v.11, p. 21-35, 2001.

Meshnick S.R. Why does quinine still work after 350 years of use? *Parasitology Today*, v.13, p. 89–90, 1997.

Meshnick S.R., Dobson M. The history of antimalarial drugs. In: Rosenthal, P. (Ed.), *Antimalarial Chemotherapy. Mechanisms of Action, Resistance, and New Directions in Drug Discovery*. Humana, Totowa, New Jersey, pp. 15–16, 2001.

Middleton E., Kandaswami C., Theoharides T.C. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: Implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological Reviews*, v. 52, n. 4, p. 673-751, 2000.

Migliore L., Coppedè F. Genetic and environmental factors in cancer and neurodegenerative diseases. *Mutation Research*, v. 512, p. 135–153, 2002.

Moll N.M.C. Uso racional de las plantas medicinales. *Pharmaceutical Care Espana*, v. 2, p. 9-19, 2000.

Montanari C. A., Bolzani V. da S. Planejamento Racional de Fármacos Baseado em Produtos Naturais. *Química Nova*, v. 24, n. 1, p. 105-111, 2001.

Moreira R.R.D., Santos L.E., Varella S.D., Varanda E.A., Vilegas W. Avaliação da atividade mutagênica do extrato etanólico bruto de *Paepalanthus latipes* e dos compostos flavonoídicos 7-metoxilados relacionados. *Revista Brasileira Farmacognosia*, v. 12, n. 1, p. 11-19, 2002.

Mori H., Sugie S., Yoshimi N., Asada Y., Furuya T., Williams G.M. Genotoxicity of a variety of pyrrolizidine alkaloids in the hepatocyte primary culture-DNA repair test using rat, mouse, and hamster hepatocytes. *Cancer Research*, v. 45, p. 3125–3129, 1985.

Motomiya A.V.A., Polezzi R.C.S., Wilson C.F., Gomes L.S.M.F., Batista S. de. Levantamento e Cultivo das Espécies de Plantas Medicinais Utilizadas em Cassilândia, MS. *Anais do 2º Congresso Brasileiro de Extensão Universitária*. Belo Horizonte, 2004.

Mueller I., Namuigi P., Kundi J., Ivivi R., Tandrapah T., B Jorge S., Reeder J.C. Epidemic malaria in the highlands of Papua New Guinea. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 72, p. 554-560, 2005.

Munro I.C., Harwood M., Hlywka J.J., Stephen A.M., Doull J., Flamm W.G., Adlercreutz H. Soy isoflavones: a safety review. *Nutrition Ver.*, v. 61, p. 1–33, 2003.

Nicoletti M., Goulart M.O., Lima R.A., Goulart A.E., Delle Monache F., Marini-Bettolo G.B. Flavonoids and alkaloids from *Strychnos pseudoquina*. *Journal of Natural Products*, v. 47, n.6, p. 953–957, 1984.

Noamesi B.K., Paine A., Kirby G.C., Warhurst D.C., Philipson G.D. In vitro anti-malarial action of cryptolepine, an indoquinoline. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 85, p. 315, 1991.

Noldin V.F., Monache F.D., Yunes R.A. Composição química e atividade biológica de *Cynara scolymus* L. cultivada no Brasil. *Química Nova*, São Paulo, v. 26, n. 3, p. 331-334, 2003.

Noster S., Kraus L. In vitro antimalarial activity of *Coutarea latiflora* and exostema-caribbean extracts on *Plasmodium-falciparum*. *Planta Médica*, v. 56, p. 63-65, 1990.

Nunes A.P.M., Araújo A.C. Ausência de genotoxicidade do esteviosídeo em *E. coli*. In. X Semana de Iniciação Científica da UERJ, Rio de Janeiro. Anais. p.15, 2003.

Nunes D.S., Koike L., Taveira J.J., Reis F.A.M. Indole alkaloids from *Aspidosperma pruinosa*. *Phytochemistry*, v. 31, p. 2507, 1992.

Ocampo-Sanchez R. A. Agrotecnología para el cultivo de quina o cascarilla. In: Martínez J. V.; Bernal, H. J.; Cáceres, A. Fundamentos de agrotecnología para el cultivo de plantas medicinales Iberoamericanas. Santafé de Bogotá, Colombia: Convenio Andrés Bello/Ciencia y Tecnología para el Desarrollo. p. 147-156, 2000.

Ojala T., Vuorela P., Kiviranta J., Vuorela H., Hiltunen R. A bioassays using *Artemia salina* for detecting phototoxicity of plant coumarins. *Planta Médica*, v. 65, p. 715–718, 1999.

Oksman-Caldentey K.M., Inze D. Plant cell factories in the post-genomic era: new ways to produce designer secondary metabolites. *Trends Plant Science*, v. 9, 2004.

Oliveira E.J., Medeiros I.A., Mukherjee R. Hypotensive and spasmolytic effects of normacusine B from *Strychnos atlantica* root. *Phytomedicine*, v. 3, p.45–49, 1996.

Park S., Hahm K.B., Oh T.Y., Jin J.H., Choue R. Preventive effect of the flavonoid, wogonin, against ethanol-induced gastric mucosal damage in rats. *Diagnostic Disease Science*, v. 49, n.3, p. 384–394, 2004.

Parra A.V., López A.G., Ruiz A.R., Ferrer J.P., Martínez R.R. Derivados antraquinónicos del *Aloe vera* L. Tamizaje genotóxico. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, v. 5(2), p. 46-50, 2000.

Peres L.E.P. Metabolismo Secundário (Apostila). Brasil/Português; Homepage: <http://www.ciagri.usp.br/~lazaropp/FisioVegGradBio/MetSec.pdf>, 2004.

Philippe G., Angenot L., Tits M., Frederich M. About the toxicity of some *Strychnos* species and their alkaloids. *Toxicon*, v. 44, p. 405–416, 2004.

Picada J.N., Silva K.V.C.L., Erdtmann B., Henriques A.T., Henriques J.A.P. Genotoxic effects of structurally related b-carboline alkaloids. *Mutation Research*, v. 379, p. 135, 1997.

Prince M.L., Hagerman A.E., Butler L.G. Tannin content of cowpeas, chickpeas, pigeon peas and mung beans. *Journal Agricultural Food Chemistry*, v. 28, p. 459–461, 1980.

Prinz A. Discovery of the cardiac effectiveness of Cinchona bark and its alkaloids. *Wien Klin Wochenschr*, n. 102, v. 24, p. 721–723, 1990.

Purves D., Harvey C., Tweats D., LumLey C.E. Genotoxicity testing: current practices and strategies used by the pharmaceutical industry. *Mutagenesis*; v. 10, n.4, p. 297–312, 1995.

Quetin-Leclercq J., Favel A., Balansard G., Regli P., Angenot L. Screening for in vitro antifungal activities of some indole alkaloids. *Planta Médica*, v. 61, p. 475–477, 1995.

Rabelo-Gay M.N., Rodrigues M.A.P.R., Monteleone Neto R. Mutagênese, teratogênese e carcinogênese: métodos e critérios de avaliação. *Revista Brasileira de Genética*, Ribeirão Preto-SP, v.1, 246p, 1991.

Rasoanaivo P., Ratsimamanga-Urverg S., Milijaona R., Rafatro H., Rakoto-Ratsimamanga A., Galeffi C., Nicoletti M. In vitro and in vivo chloroquine-potentiating action of *Strychnos myrtooides* alkaloids against chloroquine-resistant strains of Plasmodium malaria. *Planta Médica*, v. 60, p.13–16, 1994.

Rates S.M.K. Plants as sources of drugs. *Toxicon*, v. 39, p. 603–13, 2001.

Rea R.L. Cinchona y la tribu Cinchoneae (Rubiaceae) en Bolivia, actualización sistemática, fitoquímica y actividad antimalárica. 183 f. Tese (Doutorado) – Universidade Mayor de San Andrés de La Paz-Bolívia, La Paz, Bolívia, 1995.

Reher G., Kraus L., Sinnwell V., König W.A. A neoflavonoid from *Coutarea hexandra* (Rubiaceae). *Phytochemistry*, v. 22, p. 1524–1525, 1983.

Resende F.A., Barcala C.A.M.A., Faria M.C.S., Kato F.H., Cunha W.R., Tavares D.C. Antimutagenicity of ursolic acid and oleanolic acid against doxorubicin-induced clastogenesis in balb/c mice. *Life Sciences*, v. 79, p. 1268–1273, 2006.

Ribeiro L.R., Salvadori D.M.F., Marques E.K. Mutagênese ambiental. Canoas-RS, ULBRA, 356p, 2003.

Ricardo da S. J. M., Darmon N., Fernandez Y., Mitjavila S. Oxygen free radical scavenger capacity in aqueous models of different procyanidins from grape seeds. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, v. 39, p. 1549-1552, 1991.

Rice-Evans C. Flavonoid antioxidants. *Current Medicinal Chemistry*, v. 8, n. 7, p. 797-807, 2001.

Richard N., Bennett E., Roger M. Wallsgrave. Tansley Review No. 72 Secondary metabolites in plant defence mechanisms. *New Phytologist*, v. 127, p. 617-633, 1994.

Rietjens I.M.C.M., Boersma M.G., Van-Der-Woude H., Jeurissen S.M.F. Schutte M.E., Alink G.M. Flavonoids and alkenylbenzenes: Mechanisms of mutagenic action and carcinogenic risk. *Mutation Research*, v. 574, p. 124-138, 2005.

Rivas P., Cassels B.K., Morello A., Repetto Y. Effects of some  $\beta$ -carboline alkaloids on intact *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Comparative Biochemistry and Physiology*, Part C, v. 122, p. 27, 1999.

Robbrecht E. Tropical woody Rubiaceae. Characteristic features and progressions. Contribution to a new subfamilial classification. *Opera Botanica Belgica*, v. 1, p. 1-272, 1988.

Roca B. Rhabdomyolysis and hemolysis after use of *Coutarea latifl ora*. *The American Journal of Medicine*, v. 115, p. 677-677, 2003.

Rolla H.C. Avaliação da atividade mutagênica de amostras de sedimento do Rio Guaíba e lodo proveniente da indústria de papel e celulose. Tese de mestrado, UFRGS-Porto Alegre. 77p, 1995.

Ross C.A., Margolis R.L. Neurogenetics: insights into degenerative diseases and approaches to schizophrenia. *Clinical Neuroscience Research*; v. 5, p. 3-14, 2005.

Rueff J., Laires A., Gaspar J., Borba H., Rodrigues A. Oxygen species and the genotoxicity of quercetin. *Mutation Research*, v. 265, p. 75-81, 1992.

Saleem A., Husheem M., Harkonen P., Pihlaja K. Inhibition of cancer cell growth by crude extract and the phenolics of *Terminalia chebula* Retz. Fruit. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 81, p. 327-336, 2002.

Samy R.P., Gopalakrishnakone P., Ignacimuthu S. Anti-tumor promoting potential of luteolin against 7,12-dimethylbenz(a)anthracene induced mammary tumors in rats. *Chemico-Biological Interactions*, v. 164, p. 1-14, 2006.

Santos F.V., Pozeti G.L., Varanda E.A. Avaliação da mutagenicidade do extrato alcoólico de *Orbignya phalerata* Mart.. *Revista Brasileira Plantas Mediciniais*, Botucatu, v. 8, n. 4, p. 165-168, 2006a.

Santos F.V., Colus I.M.S. , Silva M.A., Vilegas W., Varanda E.A. Assessment of DNA damage by extracts and fractions of *Strychnos pseudoquina*, a Brazilian medicinal plant with antiulcerogenic activity. *Food and Chemical Toxicology* , v. 44, p. 1585–1589, 2006b.

Santos M.S., Alba R.M.S-B, Wagner V. Evaluation of *Strychnos pseudoquina* ST. HIL. Leaves Extract on Gastrointestinal Activity in Mice. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, v. 53, n.8, p. 881—885, 2005.

SBMCTA - Sociedade Brasileira de Mutagênese, Carcinogênese e Teratogênese Ambiental. Orientações básicas de execução de Testes de Mutagenicidade para a proteção da saúde humana e do meio ambiente. Séries Documentos – SBMCTA N.º. 1 – 2004.

Selma R. de P., Licínio de A.F., Maria R.F. Perfil Cromatográfico de duas espécies de Plumbaginaceae: *Plumbago scandens* L. e *Plumbago auriculata* LAM. *Química Nova*, v. 25, n. 5, p. 717-721, 2002.

Silva M.A. da, Bruna P.M.R., Hiruma-Lima C.A., Lúcia R.M. da R., Lourdes C. dos S., Miriam S., Alba R.M.S-B., Wagner V. Evaluation of *Strychnos pseudoquina* ST. HIL. Leaves Extract on Gastrointestinal Activity in Mice. *Chemistry Pharm. Bull.*, v. 53, n.8, p. 881—885, 2005.

Silva M.A. Da, Bruna P.M.R., Hiruma-Lima C.A., Lúcia R.M. da R., Lourdes C. dos S., Herrmann S.M.J.D., Heuser V., Peres, W., Marronid N. P., González-Gallego J., Erdtmann B. Evaluation of the genotoxic effect of rutin and quercetin by comet assay and micronucleus test. *Food and Chemical Toxicology*, v. 40, p. 941-947, 2002.

Silva J., Erdtmann B., Henriques J.A.P. *Genética Toxicologia*. Porto Alegre: Alcance, 422p, 2003.

Simões C.M.O., Schenkel E.P., Gosmann G., De Mello J.C.P., Mentz L.A., Petrovick P.R. *Farmacognosia da planta ao medicamento*. 5.ed., Rio Grande do Sul/Florianópolis: Editora da UFSC e Editora da UFRGS, 2003.

Simões C.M.O., Schenkel E.P., Gosmann G., Mello J.C.P., Mentz L.A., Petrovick, P.R. (Ed.) *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 4.ed. Porto Alegre: Universidade/UFRS, 833p., 2002.

Simone G.V., Maria T.K., Valquíria R., Amélia T.H., George G.O. Avaliação das variáveis de Folin-Ciocalteu para determinação do teor de taninos totais como

modelo o extrato aquoso de folhas de *Psidium guajava* L. *Química Nova*, v. 30, p. 815-820, 2007.

Sohni Y.R., Mutangadura-Mhlanga T., Kale P.G. Bacterial mutagenicity of eight medicinal herbs from Zimbabwe. *Mutation Research*, v. 322, p. 133-140, 1994.

Soobratte M.A., Neergheen V.S., Luximon-Ramma A., Aruoma O.I., Bahorun T. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: mechanism and actions. *Mutation Research*, v. 579, p. 200-213, 2005.

Spignoli G. Protective effects of dietary flavonoids on cardiovascular system and circulation. *Eur Bull Drug Research*, v. 8, p. 1-8, 2000.

Suzuki S., Takada T., Sugawara Y., Muto T., Kominami R. Quercetin induces recombinational mutations in cultured cells as detected by DNA fingerprinting. *Japan. Journal Cancer Research*, v. 82, n.10, p.1061-1064, 1991.

Tavares W. Introdução ao estudo dos antimicrobianos. In: *Manual de antibióticos e quimioterápicos anti-infecciosos*. 2. ed. Rio de Janeiro: Atheneu, p.3-13; 1996.

Thais H. A. da S., Marcelo T. de O., Hélio F. dos S., Alaíde B. de O., Wagner B. de A. Estudo de Modelagem Molecular de Complexos Ferriprotoporfirina-Ix e Quinolinocarbinolaminas Antimaláricas: Proposta de um Farmacóforo. *Quim. Nova*, Vol. 28, No. 2, 244-249, 2005.

The Committee for Veterinary Medicinal Products. Strychni Semen. Summary Report. [www.emea.eu.int/pdfs/vet/mrls/050498en.pdf](http://www.emea.eu.int/pdfs/vet/mrls/050498en.pdf) March, 1999.

THE UNITED States pharmacopeia. The national formulary – USP23. Rockville. United States Pharmacopeial Convention, 2067p., 1995.

Thomas G., Diniz M.D.F.M., Mukherjee R. Further-studies on the antidiarrheal activity of bisnordihydrotoxiferine, a tertiary indole alkaloid in rodents. *Phytochemistry Research*, v. 6, p. 84-88, 1992.

Thongphasuk P., Suttisri R., Bavovada R., Verpoort R. Alkaloids and a pimarane diterpenoid from *Strychnos vanprukii*. *Phytochemistry*, v. 64, p. 897-901, 2003.

Tits M., Damas J., Quetin-Leclercq J., Angenot L. From ethnobotanical uses of *Strychnos henningsii* to antiinflammatories, analgesics and antispasmodics. *Journal Ethnopharmacology*, v. 34, p. 261-267, 1991.

Toker G., Ku P.E., Memisoglu M., Yesilada E. Flavonoids with antinociceptive and anti-inflammatory activities from the leaves of *Tilia argentea* (silver linden). *Journal Ethnopharmacology*, v. 95, p. 393-397, 2004.

Traore F., Gasquet M., Laget M., Guiraud H., Di Giorgio C., Azas N., Doumbo O., Timon-David P. Toxicity and genotoxicity of antimalarial alkaloid rich extracts derived from *Mitragyna inermis* Kuntze and *Nauclea latifolia*. *Phytochemistry Research*, v. 14, p. 608–611, 2000.

Trevisan L.M.V., Bolzani V. da S., Lopes M.N., Young M.C., Braga M.R., Dietrich S.M., Gottlieb O.R. Problemas de Classificação de Rubiaceae: Tentativas de Solução Via Química Micromolecular. XV Reunião Anual sobre Evolução, Sistemática e Ecologia Micromoleculares (XV RESEM), livro de Resumos, p.31, 1993.

Ursini F., Rapuzzi I., Toniolo R., Tubaro F., Bontempelly J. Characterization of antioxidant effect of procyanidins. Flavonoids and other polyphenols. *Methods Enzymology*, v. 335, p. 338-350, 2001.

Vanderlinde F. A., Filho P. G., Alegrio L. V., Rocha F. F., Lorenzo M. A. de, Costa e Sousa R. H. da, Silveira J. W. de S. da, Junior A. M., Matos L. G. de, Costa E. A.. Antiinflammatory mechanism related to the antinociceptive activity of the ethanolic extract of the dichloromethano fraction from leaves of *Bathysa cuspidata* (Saint-Hilaire) Hooker. *Revista de Ciências Biológicas e Saúde*, vol. 2, n. 3, set/dez 2001.

Varanda E.A. Atividade mutagênica de plantas medicinais. *Revista Ciência Farmacêutica Básica Aplicada*; v. 27, n. 1, p. 1-7, 2006.

Vendruscolo G.S., Rates S.M.K., Mentz L.A. Dados químicos e farmacológicos sobre as plantas utilizadas como medicinais pela comunidade do bairro Ponta Grossa, Porto Alegre, Rio Grande do Sul. *Revista Brasileira Farmacognosia*, v. 15, p. 361-372, 2005.

Verpoorte R., Schripsema J., Van-Der-Leer T. Cinchona Alkaloid. Brossi. *The Alkaloids, Chemistry and Pharmacology*. V. 34, p. 331-398, 1988.

Vincken J.P., Heng L., Groot A., Gruppen H. Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom. *Phytochemistry*, v. 68, p. 275-297, 2007.

Vogel E.W., Szakmary A. Evaluation of potential mammalian genotoxins using *Drosophila melanogaster*. *Mutagenesis*, v.3, n.2, p.161-171, 1987.

Wagner H., Bland S., Zgainski E.M. Plant drug analysis. Berlim: Springer-Verlag, 320p, 1984.

Wall M. E., Wani M. C., Gaetano K., Manikumar G., Taylor H., McGivney R. Plant Antimutagenic Agents, 4. Isolation and Elucidation of Maesol, an Inactive Constituent of *Maesa* Ssp. *Journal of Natural Products*, v. 51, p. 1226-1231, 1988.

Waller D.P. Methods in ethnopharmacology. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 38, p. 189-195, 1993.

Wang C., Peng C. The mutagenicities of alkaloids and N-nitrosoguvacoline from betel quid. *Mutation Research*, v. 360, p. 165–171, 1996.

Warhurst D.C. The quinine-haemin interaction and its relationship to antimalarial activity. *Biochemical Pharmacology*, v. 30, Issue 24, p. 3323-3327 1981.

Warhurst, D.C. Cinchona alkaloids and malaria. *Acta Leidensia*, v. 55, p. 53-64, 1987.

Weeks R.A., Dobberstein R.H., Farnsworth N.R. Isolation of Paeonol from *Bathysa meridionalis*, *Lloydia*. *Journal Natural Products*, v. 40(5), p. 515-16, 1978.

World Health Organization/UNICEF. Primary health care: report of the International Conference on Primary Health Care, Alma-Ata, URSS, 1978. Geneva, p. 61, 1978.

Wright C.W., Addae-Kyereme J., Breen A.G., Brown J.E., Cox M.F., Croft S.L., Gokcek Y., Kendrick H., Phillips R.M., Pollet P.L.. Synthesis and evaluation of cryptolepine analogues for their potential as new antimalarial agents. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 44, p. 3187–3194, 2001.

Wright C.W., Philipson J.D., Awe S.O., Kirby G.C., Warhurst D.C., Quentin-Leclercq J., Angenot L.. Antimalarial action of cryptolepine and some other anhydronium bases. *Phytochemistry Research*, v. 10, p. 361–363, 1996.

Yamakoshi J., Saito M., Kataoka S., Kikuchi M. Safety evaluation of proanthocyanidin-rich extract from grape seeds. *Food and Chemical Toxicology*, v. 40, p. 599-607, 2002.

Young M.C., Araujo A.F., Da Silva C.A., Lopes M.N., Trevisan L.M., Bolzani V.S. Triterpenes and saponins from *Rudgea viburnoides*. *Journal of Natural Products*, v. 61, p. 936-938, 1998.

Zevallos P.P. Taxonomía, distribución geográfica y status del género Cinchona en el Peru. Lima, Peru: Centro de Datos para la Conservación, Universidade Nacional Agraria la Molina. 87 p, 1989.

Zhang J., Stanley R.A., Adaim A., Melton L.D., Skinner M.A. Free radical scavenging and cytoprotective activities of phenolic antioxidants. *Molecular Nutrition & Food Research*, v. 50, p. 996–1005, 2006.