

HUGO RODY VIANNA SILVA

**PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA E AVALIAÇÃO DAS AÇÕES  
MUTAGÊNICA, GENOTÓXICA E ANTIOXIDANTE DE FIGUEIRAS  
BRASILEIRAS - *FICUS* SUBG. *PHARMACOSYCEA* (MIQ.) MIQ.**

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  
2012

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

S586p  
2012

Silva, Hugo Rody Vianna, 1985-

Prospecção fitoquímica e avaliação das ações  
mutagênica, genotóxica e antioxidante de figueiras  
brasileiras - *Ficus* subg. *Pharmacosycea* (Miq.) Miq. /  
Hugo Rody Vianna Silva. – Viçosa, MG, 2012.  
59f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: João Paulo Viana Leite.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 53-59

1. *Ficus* (Planta).
  2. Mutação (Biologia).
  3. Genotoxicidade.
  4. Antioxidantes.
  5. Plantas medicinais.
  6. Ervas - Uso terapêutico. I. Universidade Federal de Viçosa.
- II. Título.

CDD 22. ed. 583.45

HUGO RODY VIANNA SILVA

**PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA E AVALIAÇÃO DAS AÇÕES  
MUTAGÊNICA, GENOTÓXICA E ANTIOXIDANTE DE FIGUEIRAS  
BRASILEIRAS - *FICUS* SUBG. *PHARMACOSYCEA* (MIQ.) MIQ.**

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: 16 de fevereiro de 2012.

---

Luciano Gomes Fietto  
(Coorientador)

---

Leandro Licursi de Oliveira

---

João Paulo Viana Leite  
(Orientador)

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu Deus, que tudo me concedeu.

A Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola, pela oportunidade de realização deste trabalho.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

Ao Professor João Paulo Viana Leite pelos conhecimentos repassados e amizade.

Ao Professor Luciano Gomes Fietto pelos conselhos e ensinamentos.

A professora Virgínia Ramos Pizziolo pela valiosa presteza.

Aos meus pais Nélio e Tânia que me ensinaram a trilhar no caminho de Deus.

A minha amada esposa Yhasmin, pelo amor, amizade e companheirismo.

Aos amigos: Alisson Andrade, Bruno Vinicius, Evan Visser, Gustavo Leão, Marcelo Santana, Matheus Bastos, Pedro Paulo de Souza e Victor Coelho pelo apoio fraterno.

Ao amigo Douglas C. Gontijo por prestar inesgotável amizade, companheirismo e sua extrema humildade em repassar conhecimentos.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	v
LISTA DE TABELAS .....	vii
RESUMO .....	ix
ABSTRACT .....	xi
1 INTRODUÇÃO .....	13
2 REVISÃO DE LITERATURA .....	14
2.1 Figueiras .....	14
2.1.1 Taxonomia .....	15
2.2 Ações mutagênica e genotóxica .....	18
2.3 Teste de mutação gênica reversa com <i>Salmonella typhimurium</i> .....	19
2.4 Teste de clivagem de DNA plasmidial .....	20
2.5 Ação antioxidante .....	21
3 OBJETIVOS .....	23
3.1 Objetivo Geral .....	23
3.2 Objetivos Específicos .....	23
4 METODOLOGIA .....	23
4.1 Coleta e identificação do material vegetal .....	23
4.2 Secagem do material vegetal e obtenção dos extratos secos .....	24
4.3 Prospecção fitoquímica .....	25
4.4 Quantificação de polifenóis totais .....	25
4.5 Avaliação antioxidante total pelo sistema $\beta$ -caroteno/ácido linoleico .....	27
4.6 Avaliação antioxidante pelo método de captura do radical livre DPPH .....	28
4.7 Testes de mutagenicidade .....	29
4.7.1 Controles positivos e linhagens de <i>S. typhimurium</i> .....	29
4.7.2 Verificação das características genéticas das cepas de <i>S. typhimurium</i> .....	30
4.7.3 Meios de cultura .....	31
4.7.4 Ensaio de mutagenicidade .....	31
4.7.5 Análise dos resultados mutagênicos .....	32
4.7.6 Considerações de segurança .....	32
4.7.7 Teste de citotoxicidade .....	32
4.8 Testes de genotoxicidade .....	33
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	34
5.1 Coleta e Identificação do Material Vegetal .....	34
5.2 Obtenção dos extratos .....	34
5.3 Prospecção Fitoquímica .....	35

5.4	Quantificação de polifenóis totais.....	36
5.5	Avaliação antioxidante total pelo sistema $\beta$ -caroteno/ácido linoleico .....	36
5.6	Avaliação antioxidante pelo método de captura do radical livre DPPH.....	38
5.7	Testes de mutagenicidade .....	41
5.7.1	Teste de citotoxicidade.....	41
5.7.2	Ensaio de mutagenicidade .....	42
5.8	Teste de genotoxicidade .....	48
6	CONCLUSÕES .....	52
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Exsiccatas de espécies de <i>Ficus</i> .....	17
<b>Figura 2:</b> Esquema de reação química mostrando a estabilização do radical livre DPPH.....	22
<b>Figura 3:</b> Localização geográfica de coleta das espécies de <i>Ficus</i> .....	24
<b>Figura 4:</b> Comparação da atividade antioxidante dos extratos secos de folhas de espécies de quatro espécies de <i>Ficus</i> (100 µg/mL) e BHT (75 µg/mL) analisadas pelo Sistema β-caroteno/ácido linoleico.....	37
<b>Figura 5:</b> Porcentagem de inibição da oxidação dos extratos secos (100 µg/mL) de quatro espécies de <i>Ficus</i> e BHT (75 µg/mL) analisadas pelo Sistema β-caroteno/ácido linoleico.....	37
<b>Figura 6:</b> Correlação de Pearson entre a concentração de polifenóis totais e capacidade antioxidante dos extratos secos de folhas de quatro espécies de <i>Ficus</i> .....	38
<b>Figura 7:</b> Comparação das curvas obtidas pelo método de captura do radical livre DPPH para cálculo do valor IC <sub>50</sub> dos extratos secos de quatro espécies de <i>Ficus</i> e BHT.....	40
<b>Figura 8:</b> Comparação do valor IC <sub>50</sub> (µg/mL), calculado pelo método de Captura do Radical Livre DPPH, entre os extratos secos das quatro espécies de <i>Ficus</i> e BHT.....	41
<b>Figura 9:</b> Eletroforese em gel de agarose a 0,8% do plasmídeo pUC18, após tratamento com 15 mg de extrato seco de espécies de <i>Ficus</i> .....	49
<b>Figura 10:</b> Eletroforese em gel de agarose a 0,8% do plasmídeo pUC18, após tratamento com 7,5 mg de extrato seco de espécies de <i>Ficus</i> .....	49
<b>Figura 11:</b> Eletroforese em gel de agarose a 0,8% do plasmídeo pUC18, após tratamento com 1 mg de extrato seco de espécies de <i>Ficus</i> .....	50
<b>Figura 12:</b> Eletroforese em gel de agarose a 0,8% do plasmídeo pUC18, após tratamento com as seguintes concentrações de C-: controle negativo (20 µg DNA pUC18 + 100 µL H <sub>2</sub> O); PI: 20 µg DNA pUC18 + 1 mg extrato <i>F. pulchella</i> ; PII: 20 µg DNA pUC18 + 1 mg extrato <i>F. pulchella</i> (extrato aquecido a 97 °C por 10 minutos); PIII: 20 µg DNA pUC18 + 1 mg extrato <i>F. pulchella</i> + 100 µg/mL ampicilina; PIV: 20 µg DNA pUC18 + 1 mg extrato	

<i>F. pulchella</i> + 20 µL EDTA 10 mM. Forma I: conformação superhelicoidal....	50
<b>Figura 13:</b> Eletroforese em gel de agarose a 0,8% do plasmídeo pUC18, após tratamento com as seguintes concentrações de C-: controle negativo (20 µg DNA pUC18 + 100 µL H <sub>2</sub> O); P1: 20 µg DNA pUC18 + 1 mg extrato <i>F. pulchella</i> ; P2: 20 µg DNA pUC18 + 1 mg extrato <i>F. pulchella</i> + 80 µg proteinase K. Forma I: conformação superhelicoidal.....	51

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Local de coleta das espécies de <i>Ficus</i> .....	23
<b>Tabela 2:</b> Fases móveis, reveladores e padrões de referência utilizados para prospecção fitoquímica dos extratos secos das espécies de <i>Ficus</i> .....	26
<b>Tabela 3:</b> Características genéticas das linhagens de <i>S. typhimurium</i> mais comumente utilizadas no ensaio de mutagenicidade.....	30
<b>Tabela 4:</b> Controles positivos utilizados no ensaio mutagenicidade para diferentes linhagens de <i>S. typhimurium</i> .....	30
<b>Tabela 5:</b> Exsicatas das quatro espécies de <i>Ficus</i> depositadas no Herbário VIC.....	34
<b>Tabela 6:</b> Rendimento dos extratos secos das folhas de espécies de <i>Ficus</i> .....	34
<b>Tabela 7:</b> Resultados da prospecção fitoquímica, por cromatografia de camada delgada, dos extratos secos de quatro espécies de <i>Ficus</i> .....	35
<b>Tabela 8:</b> Concentração de polifenóis totais nos extratos secos das amostras de <i>Ficus</i> analisadas em triplicata e desvio padrão.....	36
<b>Tabela 9:</b> Porcentagem de captura do radical livre DPPH e desvio padrão do extrato seco das folhas de quatro espécies de <i>Ficus</i> .....	39
<b>Tabela 10:</b> Citotoxicidade expressa pela média de UFC da linhagem TA100 (S9-) de <i>Salmonella typhimurium</i> expostas a 15 mg/placa de extratos secos de três espécies de <i>Ficus</i> e o controle positivo.....	42
<b>Tabela 11:</b> Atividade mutagênica expressa pela média do número de revertentes e desvio padrão nas linhagens TA97a, TA98, TA100 e TA102 de <i>S. typhimurium</i> expostas a várias doses dos extratos secos das folhas de três espécies de <i>Ficus</i> com (S9+) ou sem (S9-) ativação metabólica.....	43
<b>Tabela 12:</b> Atividade mutagênica expressa pela Razão de Mutagenicidade nas linhagens TA97a, TA98, TA100 e TA102 de <i>S. typhimurium</i> expostas a várias doses dos extratos secos das folhas de três espécies de <i>Ficus</i> com (S9+) ou sem (S9-) ativação metabólica.....	45
<b>Tabela 13:</b> Correlação dose-resposta calculada pela regressão linear da média do número de revertentes nas linhagens TA97a, TA98, TA100 e TA102 de <i>S. typhimurium</i> expostas à várias doses dos extratos secos de três espécies de <i>Ficus</i> com (S9+) ou sem (S9-) ativação metabólica.....	46

**Tabela 14:** Atividade mutagênica positiva, negativa ou indício de mutagenicidade nas linhagens TA97a, TA98, TA100 e TA102 de *S. typhimurium* expostas à várias doses dos extratos secos das folhas de três espécies de Ficus com (S9+) ou sem (S9-) ativação metabólica..... 47

## RESUMO

SILVA, Hugo Rody Vianna, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2012. **Prospecção fitoquímica e avaliação das ações mutagênica, genotóxica e antioxidante de figueiras brasileiras - *Ficus* subg. *Pharmacosycea* (Miq.) Miq.** Orientador: João Paulo Viana Leite. Coorientadores: Luciano Gomes Fietto e Virgínia Ramos Pizziolo.

O gênero *Ficus*, representado por plantas popularmente conhecidas no Brasil como figueiras, constitui um dos maiores gêneros de angiospermas com mais de 800 espécies distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais de todo o mundo. Existe grande interesse na pesquisa de produtos florestais não-madeiros de espécies do gênero *Ficus*, principalmente pelo fato de existirem vários relatos do uso tradicional dessas plantas como alimentos e medicamentos. Dada importância de se investigar a composição química e os efeitos toxicológicos de espécies vegetais utilizadas na medicina popular, o presente estudo visou a prospecção fitoquímica de extratos de folhas de quatro espécies de *Ficus*, bem como quantificação de polifenóis totais pelo método de Folin-Ciocalteu, e avaliação da ação antioxidante utilizando o sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico e método de captura do radical livre DPPH. Para três desses extratos foram avaliadas as atividades mutagênica pelo ensaio de mutação gênica reversa com *Salmonella typhimurium*, com e sem metabolização; e genotóxica pelo teste de clivagem plasmidial com o plasmídeo pUC18. A prospecção fitoquímica revelou metabólitos secundários das classes de taninos e flavonóides nos extratos das espécies de *F. pulchella*, *F. adhatodifolia*, *F. nevesiae* e *F. obtusiuscula*. Os extratos de *F. pulchella* e *F. obtusiuscula* apresentaram maiores teores de polifenóis totais (117 e 127,26 mg EAT/g, respectivamente) e também maiores potenciais antioxidantes avaliados pelos dois métodos utilizados neste estudo. No ensaio de mutação gênica reversa com *Salmonella typhimurium*, o extrato de *F. pulchella* foi considerado mutagênico para as linhagens TA98 (S9+ e S9-), TA100 (S9-) e TA102 (S9+). Os extratos de *F. adhatodifolia* e *F. obtusiuscula* foram considerados mutagênicos positivos apenas para a linhagem TA102 (S9+). Esses dois últimos extratos também apresentaram potencial genotóxico na dose de 1 mg, indicado pela diminuição da conformação superhelicoidal do DNA plasmidial. O efeito genotóxico do extrato de *F. pulchella* não pode ser avaliado devido ao não surgimento de bandas de DNA no gel de agarose, atribuída à degradação do DNA plasmidial por polifenóis. Os resultados obtidos neste estudo indicam a presença de altos teores de

compostos fenólicos nas quatro espécies de *Ficus* avaliadas, indicando possível atribuição de ação antioxidante a esses compostos presentes nos extratos hidrofílicos, sendo observada pelo método do  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico correlação entre o teor de polifenóis e atividade antioxidante. A detecção de ação mutagênica para as espécies *F. pulchella*, *F. adhatodifolia* e *F. obtusifolia* e de efeito genotóxico para estas duas últimas dentro das doses avaliadas remete ao uso mais cauteloso dessas espécies na medicina popular, já que eles atuam diretamente sobre o DNA. Contudo, mais estudos devem ser realizados com estas espécies de *Ficus* para atestar sua potencial toxicidade.

## ABSTRACT

SILVA, Hugo Rody Vianna, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2012. **Phytochemistry prospection and evaluation of mutagenic, genotoxic and antioxidant activities from brazilian fig species - *Ficus* subg. *Pharmacosycea* (Miq.) Miq.** Adviser: João Paulo Viana Leite. Co-Advisers: Luciano Gomes Fietto and Virgínia Ramos Pizziolo.

The genus *Ficus*, represented by plants popularly known as figs, makes up one of the largest genera of angiosperms with more than 800 species distributed in tropical and subtropical regions around the world. There is great interest in the study of non-timber forest product species of the genus *Ficus*, especially because there are several reports on the traditional use of these plants as food and medicine sources. Given the importance of investigating the chemical composition and toxicological effects of plant species used in folk medicine, the objective of this study was to explore phytochemical extracts of leaves from four species of *Ficus*, as well as quantify total polyphenols by the Folin-Ciocalteu method and evaluate antioxidant activity using the  $\beta$ -carotene/linoleic acid system and method for capture of the free radical DPPH. For three of these extracts the mutagenic activities were evaluated by the reverse mutation test with *Salmonella typhimurium*, with and without metabolization; and genotoxic potential on plasmid DNA pUC18. Phytochemical prospection revealed secondary metabolites of the classes of tannins and flavonoids in extracts of the species *F. pulchella*, *F. adhatodifolia*, *F. nevesiae* and *F. obtusiuscula*. The extracts of *F. pulchella* and *F. obtusiuscula* showed higher levels of total polyphenols (117 and 127.26 mg TAE/g, respectively) and higher antioxidant potential assessed by the two methods used in this study. In the test with *Salmonella typhimurium*, the extract of *F. pulchella* was considered mutagenic for the strains TA98 (S9+ and S9-), TA100 (S9-) and TA102 (S9+). The extracts of *F. adhatodifolia* and *F. obtusiuscula* were considered mutagenic only for the strain TA102 (S9+). These last two extracts also showed genotoxic effect in a dose of 1 mg, indicated by the decrease in superhelical conformation of the plasmid DNA. Genotoxic effects of the *F. pulchella* extract could not be assessed since no DNA bands were observed on the agarose gel, attributed to the degradation of plasmid DNA by polyphenols. Results obtained in this study indicate the presence of high levels of phenolic compounds in the four *Ficus* species evaluated, indicating the

possible attribution of antioxidant action to these compounds present in hydrophilic extracts; was observed by the method of  $\beta$ -carotene/linoleic acid correlation between polyphenol content and antioxidant activity. The detection of mutagenic action for the species *F. pulchella*, *F. adhatodifolia* and *F. obtusiuscula*, and genotoxic effects for these last two in the doses evaluated indicates that these species should be used with care in folk medicine, because they act directly on DNA. However, further studies should be conducted with these *Ficus* species to confirm its potential toxicity.

## 1 INTRODUÇÃO

A pesquisa por produtos naturais de origem vegetal visando novos compostos bioativos tem se tornado, ao longo das últimas décadas, uma importante estratégia para a descoberta de novos fármacos, como também, para a conservação da biodiversidade, fomento a atividade econômica e aumento da qualidade de vida em países desenvolvidos e em desenvolvimento (Patwardhan et al., 2004).

Estima-se que aproximadamente 25% dos medicamentos modernos derivem direta ou indiretamente de fontes naturais, o que representou, no ano de 2008, uma cifra em torno de US\$ 86 bilhões, com esta taxa em aumento exponencial (WHO, 2011). Dentro desse cenário, a comercialização de fitoterápicos é responsável por uma significativa parcela monetária do mercado mundial de medicamentos.

Cerca de 70% a 95% da população de países em desenvolvimento, especialmente na África, Ásia, América Latina e Oriente Médio usam a medicina tradicional na manutenção primária à saúde. Assim como nos países em desenvolvimento, a utilização da medicina tradicional nos países desenvolvidos é igualmente significativa; em torno de 70% a 90% da população têm usado este tipo de cuidado com a saúde com a alcunha de “práticas integrativas e complementares a de saúde” como no Canadá, França, Alemanha e Itália (WHO, 2011).

No mercado brasileiro, estima-se que as vendas de medicamentos originados de plantas medicinais tenham atingido a cifra de US\$ 550 milhões no ano de 2001 (Knapp, 2001) e que as vendas nesse setor cresçam 10% ao ano.

Diante do aumento no uso de produtos fitoterápicos, bem como de estudos que demonstram sua eficácia terapêutica (Briskin, 2000; Ang-Lee et al., 2001; Chan, 2003), surgiu o interesse do governo brasileiro pela implantação de serviços de fitoterapia no Sistema Único de Saúde (SUS). Importante ressaltar, que tal atitude segue as orientações da Organização Mundial de Saúde (OMS), que aponta para a valorização das práticas terapêuticas complementares e integrativas e sua implementação em programas de assistência primária à saúde.

Em 2006, duas importantes políticas que dizem respeito a plantas medicinais e fitoterápicos foram publicadas no Brasil, a saber: Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS (BRASIL, 2006a), que prevê a inserção no SUS de serviços relacionados à, fitoterapia, medicina tradicional chinesa/acupuntura, homeopatia e termalismo social; e a Política Nacional de Plantas Medicinais e

Fitoterápicos (BRASIL, 2006b), cujo objetivo é garantir à população brasileira o acesso seguro e o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos, promovendo o uso sustentável da biodiversidade, o desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria nacional (BRASIL, 2010).

As plantas medicinais podem possuir metabólitos secundários de várias classes químicas como: flavonóides, taninos e alcalóides. Estudos apontam que alguns taninos possuem capacidade antioxidante, comparada a vitamina C (Pessuto et al., 2009). Entretanto, outros estudos mostram que alguns taninos podem ser pró-oxidantes e genotóxicos (Labieniec et al., 2003). Este paradoxo mostra a importância de estudos genotóxicos e mutagênicos para conferir o uso seguro e racional das plantas medicinais à população, levando em consideração que para classificar um agente como antioxidante ou pró-oxidante é preciso analisá-lo frente a alvos específicos, como o DNA.

Nesse contexto, importante ressaltar que o Brasil é o país que possui a maior reserva de diversidade biológica do mundo. O bioma Mata Atlântica agrega enorme quantidade de recursos naturais, porém, a demanda por madeira e a expansão das fronteiras agrícolas, dentre outros fatores, promoveram drástica redução de sua área florestal. Hoje, apenas cerca de 8% da área total desse bioma permanecem com a cobertura original (Fundação SOS Mata Atlântica e INPE, 1993). Também se destacam no cenário da Mata Atlântica o recorde de plantas lenhosas (angiospermas) por hectare (450 espécies no sul da Bahia), cerca de 20 mil espécies vegetais, sendo 8 mil delas endêmicas, além de recordes de quantidade de espécies e endemismo em vários outros grupos de plantas (Fundação SOS Mata Atlântica, 2010). Este conjunto de fatores estabelece um cenário com grande potencial para o desenvolvimento de pesquisas que objetivam a descoberta de novas drogas.

## **2 REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 Figueiras**

No Brasil a família Moraceae é representada por 28 gêneros e aproximadamente 340 espécies (Barroso et al., 2010). O gênero *Ficus* constitui um dos maiores gêneros de angiospermas com mais de 800 espécies de árvores, epífitas e arbustos nas regiões tropicais e subtropicais do mundo inteiro, popularmente

conhecidas como figueiras, gameleiras, lombrigueiras, dentre outros (Singh et al., 2011). O gênero é dividido em cinco subgêneros (Berg, 2001), sendo que dois deles ocorrem na região neotropical, *Pharmacosycea* (Miq.) Miq., com cerca de 20 espécies e *Urostigma* (Gasp.) Miq., com cerca de 100 espécies, e são representados nesta região exclusivamente pelas seções *Pharmacosycea* e *Americana* Miq., respectivamente (Carauta, 1989; Berg e Villavicencio, 2004).

O interesse popular, tecnológico e científico pela família Moraceae é facilmente compreendido pelos produtos e sub-produtos obtidos de seus representantes, como borracha, madeira, alimentos, tecidos, medicamentos, e como elemento paisagístico (Mello Filho, 1963; Carauta, 1989; Carauta e Diaz, 2002).

Diferentes partes de *Ficus carica*, *Ficus sycomorus* e *Ficus religiosa* como frutos, folhas, casca, ramos, brotos e látex são utilizadas na medicina tradicional para tratamento de tumores, carcinomas e doenças caracterizadas por inflamação. Preparações medicamentosas feitas a partir das folhas de *F. carica* são utilizadas como cataplasma para tratamento de carcinomas, inchaços e dermatites, bem como comer seus frutos são indicados para úlceras (Lanskya et al., 2008; Singh, et al., 2011). O infuso de folhas secas de *F. maxima*, nativa da Amazônia brasileira, é utilizado por via oral como agentes anti-helmínticos e anti-reumáticos (Diaz et al., 1997).

O látex de *F. carica* foi objeto de estudo de Ullman et al. (1945). O extrato obtido deste látex foi capaz de inibir o crescimento de sarcoma induzido por benzo- $[\alpha]$ -pireno e resultou no desaparecimento de pequenos tumores em ratos albinos. Os resultados obtidos por Ullman inspiraram o trabalho de Rubnov et al. (2001), que conseguiram isolar e elucidar estruturas isoméricas de 6-*O*-acil- $\beta$ -D-glicosil-sitosterol do látex de *F. carica* que demonstraram atividade anti-proliferativa em diversas linhagens de células tumorais.

### **2.1.1 Taxonomia**

A família Moraceae possui 37 gêneros e cerca de 1.100 espécies distribuídas por todas as regiões tropicais e temperadas do mundo (Clement e Weiblen, 2009). A família foi dividida em cinco tribos: Ficeae, Castilleae, Dorstenieae, Moreae e Artocarpeae. Ficeae é uma tribo monogenérica representada pelo gênero *Ficus* (Berg, 1989b; Berg, 2001).

O gênero *Ficus* é suplantado entre as Angiospermas somente por *Astragalus* (Leguminosae), *Euphorbia* (Euphorbiaceae), *Solanum* (Solanaceae), *Pleurothallis* e *Bulbophyllum* (Orchidaceae). Destes, *Ficus* se destaca por ser o gênero com maior número de espécies arbóreas (Carauta e Diaz, 2002). *Ficus* foi subdividido em cinco subgêneros: *Ficus*, *Sycidium*, *Sycomorus*, *Urostigma* e *Pharmacosycea*, sendo as espécies brasileiras pertencentes aos dois últimos (Berg, 1989b; Carauta e Diaz, 2002).

O subgênero *Pharmacosycea* possui cerca de 75 espécies em todo o mundo. É dividido em duas seções: *Pharmacosycea* sect. *Oreosycea*, com cerca de 50 espécies distribuídas na África, Ásia e Australásia e *Pharmacosycea* sect. *Pharmacosycea* com cerca de 20 espécies neotropicais (Berg, 1989a). No Brasil, estima-se que existam cerca de 100 espécies nativas de *Ficus*, das quais aproximadamente 65 estão descritas, sendo 58 do subgênero *Urostigma* sect. *Americana* e apenas 8 do subgênero *Pharmacosycea* sect. *Pharmacosycea* (Carauta e Diaz, 2002).

É reportado na literatura um provável monofiletismo do subgênero *Urostigma* e um polifiletismo do subgênero *Pharmacosycea*, sendo ainda que as espécies da seção *Pharmacosycea* amostradas nestes estudos sempre aparecem como grupo-irmão do restante das espécies do gênero (Weiblen, 2000; Datwyler e Weiblen, 2004; Clement e Weiblen, 2009).

No subgênero *Pharmacosycea*, a maioria das espécies trata-se de árvores terrestres, muitas vezes ribeirinhas, estabelecidas em locais mais ou menos perturbados, uma característica que pode ser relacionada com a necessidade de luz para germinação de suas sementes (Berg, 2001; Berg, 2006).

É comum em trabalhos com a taxonomia ou florística do grupo, citações que enfatizam as semelhanças entre as espécies (Figura 1):

“... *Ficus nevesiae* é afim de *Ficus adhatodifolia* e distinta dessa espécie pela forma do sicônio, pela superfície verrucosa e pelo ostíolo crateriforme” (Carauta e Diaz, 2002).

“... *Ficus pulchella*... há semelhança desta espécie com *F. piresiana* da Venezuela” (Carauta e Diaz, 2002).

“... *Ficus adhatodifolia* é espécie similar a *F. insipida* Wild., diferenciando desta por apresentar estípula terminal mais curta e espessa (vs. estípula terminal longa e

não espessa) e pelo interior rosado a avermelhado do sicônio (vs. interior do sicônio branco)” (De Souza, 2009)

“... *Ficus obtusiuscula* se mostra muito próxima de *F. adhatodifolia*, diferindo desta por apresentar sicônios bem menores (vs. sicônios grandes), assim como as estípulas e folhas longas (vs. estípulas e folhas menores), ao contrário de *F. adhatodifolia* que vive em vários habitats, *F. obtusiuscula* prefere a beira dos cursos d’água ou locais de solo muito úmido” (De Souza, 2009).

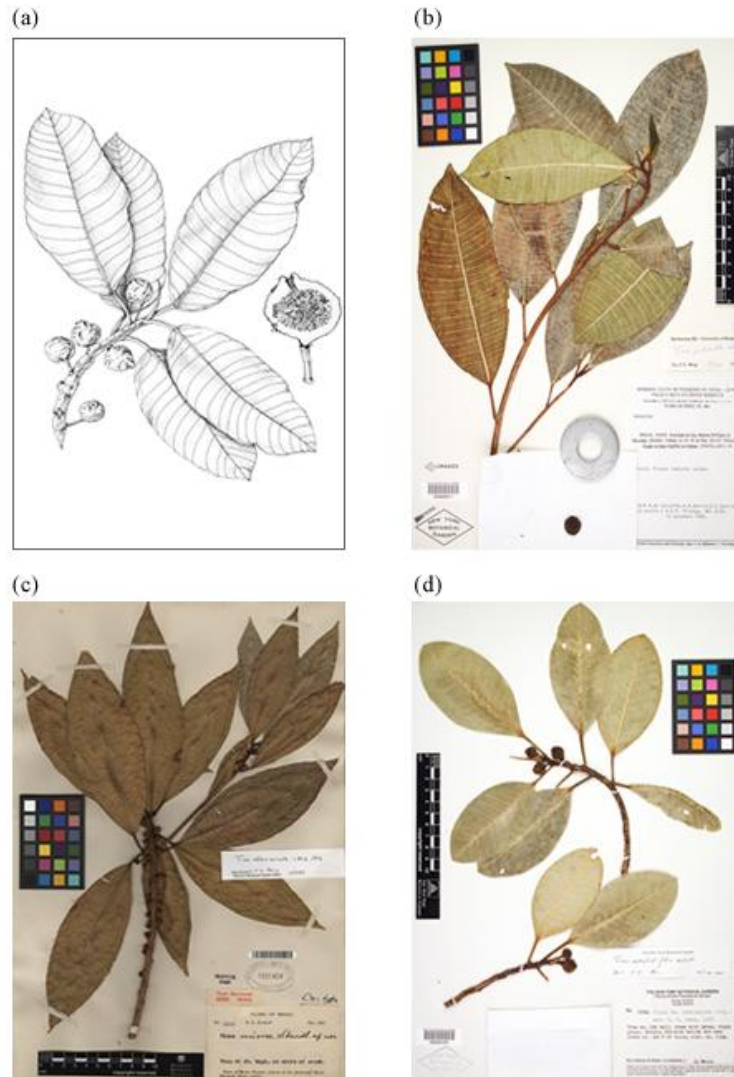


Figura 1. Exsicatas de espécies de *Ficus*: (a) *Ficus nevesiae* (Pederneiras et al., 2011), (b) *Ficus pulchella* (NYBG, 2011), (c) *Ficus obtusiuscula* (MOBOT, 2011), (d) *Ficus adhatodifolia* (NYBG, 2011).

## 2.2 Ações mutagênica e genotóxica

Mutagênese é definida como alterações permanentes e herdáveis no material genético (DNA) de um determinado organismo, diferentemente de alteração genotóxica, que são as que causam prejuízos ao material genético como a quebra de fita simples ou dupla, lesão cromossomal e outras. Os compostos químicos capazes de causar lesões ao DNA e de promover aumento da frequência de mutações na molécula de DNA, são denominados agentes mutagênicos. Fatores como a radiação UV também podem causar danos desse tipo ao DNA e outros constituintes celulares, sendo também, considerados agentes mutagênicos (Snyder e Champness, 2007).

Os agentes mutagênicos que inativam genes supressores ativam proto-oncogenes e telomerasas, estimulam a proliferação e inibem a morte celular, podendo levar a iniciação de um câncer (Hahn e Weinberg, 2002).

Os agentes mutagênicos podem causar danos ao DNA por diferentes mecanismos. Além disso, mutações espontâneas podem ocorrer durante a replicação do material genético de um organismo, apesar da evolução ter se encarregado de moldar um sistema de replicação e reparos capaz de minimizar estes erros, permitindo a estabilidade do DNA e a continuidade das espécies.

Qualquer molécula de DNA pode sofrer mutação. Mutações pontuais envolvem modificações em um único par de bases e pode ser o resultado de uma desordem bioquímica celular ou devido a ação de agentes mutagênicos. A adição ou deleção de um ou mais pares de bases causam mutações do tipo deslocamento do quadro de leitura (*frame-shift*), como a 9-aminoacridina, que intercalam-se entre as bases, na mesma fita do DNA, e alteram a fase de leitura de todas as trincas de pares de bases do gene, depois do sítio mutado. As mutações causadas por substituição de pares de base podem alterar a sequência de aminoácidos de uma proteína. Se esta mudança for capaz de alterar a função bioquímica desta proteína, poderá interferir no fenótipo do organismo (Zaha et al., 2003).

Muitas espécies vegetais, por serem produtos naturais, são consideradas erroneamente como inofensivas à saúde, sendo empregadas na medicina popular sem que tenham sido realizadas pesquisas sobre sua segurança de uso. Em um estudo realizado por Ferreira e Vargas (1999), empregando extratos de *Myrciaria tenella* Berg. (Myrtaceae), *Smilax campestris* Griseb. (Smilacaceae), *Tripodanthus acutifolius* Tiegh. (Loranthaceae) e *Cassia corymbosa* Benth. (Leguminosae), usadas na

medicina tradicional no sul do Brasil, todos os extratos apresentaram atividade mutagênica quando avaliadas em ensaios com a *Salmonella typhimurium*. A mutagenicidade observada foi atribuída a flavonóides, taninos e antraquinonas presentes naqueles extratos.

O gel de *Aloe vera* (L.) Burm.F., popularmente conhecido como babosa é largamente utilizado no Brasil para cicatrização de queimaduras, atuação sobre dermatites, irritações de pele após exposição ao sol, irritações do couro cabeludo, infecções fúngicas e queda de cabelo. Pela sua ampla utilização, o gel da babosa é incorporado à preparação de sabonetes, xampus, condicionadores e cremes, dentre outros. No entanto, o extrato da polpa *Aloe vera*, apesar de não apresentar toxicidade para a membrana celular, apresentou potencial genotóxico em estudos conduzidos por Paes-Leme et al. (2005).

Contudo, a detecção e avaliação do potencial mutagênico e genotóxico de espécies vegetais são de fundamental importância para reduzir possíveis riscos à saúde pela utilização destes compostos. Diversos países e organizações regionais têm buscado modelos para regulamentar a medicina tradicional e os medicamentos fitoterápicos. No Brasil o órgão responsável pela regulamentação de novos fitoterápicos é a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), que pela Resolução RDC nº. 14 de 31 de março de 2010 estabelece os requisitos mínimos para o registro de medicamentos fitoterápicos.

### **2.3 Teste de mutação gênica reversa com *Salmonella typhimurium***

O teste de mutação gênica reversa com *Salmonella typhimurium*, conhecido como teste de Ames, tem sido amplamente usado para avaliar a mutagenicidade de substâncias e misturas biológicas complexas. Um considerável número de substâncias primariamente detectadas como mutagênicas pelo teste de Ames têm sido subsequentemente mostradas como carcinogênicas em testes com animais (Maron e Ames, 1983).

O teste de Ames caracteriza-se pela utilização de linhagens de *Salmonella enterica subsp. enterica* sorotipo Typhimurium LT2 auxotróficas para o aminoácido histidina e sensíveis à substâncias capazes de induzir diferentes tipos de mutações. Desta forma, o método baseia-se na indução de mutações, nestas linhagens, que

revertem seu caráter auxotrófico para histidina e passam a crescer, formando colônias em meio desprovido deste aminoácido.

As linhagens de *S. typhimurium* utilizadas no teste de mutação gênica reversa tem a resposta SOS otimizada pela presença do plasmídio pKM101, que carrega os genes *mucAB*, alelos de *umuCD* de bactérias, e é responsável pelo aumento do tipo de reparo sujeito ao erro, o que aumenta a sensibilidade das linhagens na detecção de mutágenos. Este tipo de sistema de reparo, chamado Sistema SOS, é induzido como uma resposta emergencial para evitar a morte celular na presença de dano significativo ao DNA.

Este teste mutagênico ainda utiliza linhagens com outros tipos de mutações que aperfeiçoam a identificação de substâncias capazes de lesar o DNA, como a deleção do gene *rfa*, que causa perda parcial da barreira de lipopolissacarídeos da parede bacteriana, facilitando a difusão de moléculas grandes para o interior da célula, como aminas aromáticas, hidrocarbonetos e aflatoxinas; e deleção de *uvrB*, um dos genes responsáveis pelo reparo da molécula de DNA por excisão, o que permite que maior número de lesões sejam reparadas por mecanismos de reparo sujeitos a erro, aumentando assim a sensibilidade na detecção de mutágenos. Por razões técnicas a deleção no gene *uvrB* se estendeu através do gene da biotina e como consequência, essas linhagens também requerem a presença dessa vitamina para o seu crescimento (Maron e Ames, 1983).

Algumas substâncias carcinogênicas necessitam ser metabolizadas por enzimas do citocromo P450 para se tornarem biologicamente ativas sobre o DNA. Como as cepas de *Salmonella typhimurium* são desprovidas deste sistema de metabolização, é incorporado ao teste de Ames um sistema exógeno de ativação metabólica juntamente à substância teste e bactérias. Esta ativação metabólica consiste em um mix de enzimas (fração microsomal S9) obtidas a partir de fígado de mamíferos (Mortelmans et al., 2000).

## **2.4 Teste de clivagem de DNA plasmidial**

A avaliação genotóxica por clivagem plasmidial (De Mattos et al. 2000) utiliza-se da mudança topológica do DNA plasmidial em contato com agentes genotóxicos, como por exemplo, o cloreto de estanho ( $\text{SnCl}_2$ ) (Dantas et al., 1999).

Por meio de eletroforese em gel de agarose 0,8%, avalia-se o efeito genotóxico do extrato pela análise da manutenção da presença da conformação circular relaxada (forma III), conformação helicoidal (forma II) e da forma tensionada superhelicoidal (forma I “*percorre maior distância no gel*” – duas fitas fechadas em conformação original). A comparação com o perfil das bandas do DNA plasmidial clivado pelo cloreto de estanho auxilia no diagnóstico de possível ação genotóxica dos extratos.

## **2.5 Ação antioxidante**

O oxigênio pode originar diversas espécies reativas (EROs), que incluem radicais livres e espécies não radicalares. O radical livre é qualquer espécie química capaz de existir independentemente e possui um ou mais elétrons desemparelhados ocupando orbitais atômicos ou moleculares. As EROs são geralmente instáveis e podem reagir com compostos e estruturas celulares, causando prejuízos à saúde.

Compostos antioxidantes podem proteger os sistemas biológicos contra os efeitos potencialmente danosos das espécies reativas de oxigênio, estando dentre os compostos de maior interesse para a saúde humana. Alguns podem ser considerados agentes anticarcinogênicos naturais por possuírem relação com a prevenção de câncer e inúmeras outras doenças relacionadas a reações de oxidação, como patologias cardiovasculares e doenças neurodegenerativas, atuando como fatores de proteção e fortalecendo os mecanismos de proteção fisiológica (De Flora et al., 1992; Yagi et al., 2002). No caso de supressão da carcinogênese, os efeitos relatados pelos antioxidantes são consistentes com a visão de que os radicais livres estão envolvidos como agentes fundamentais no processo de desenvolvimento de câncer (Hartman e Shankel, 1990).

Os compostos fenólicos são constantemente relacionados como potentes agentes antioxidantes, e dentre estes compostos, os flavonóides como antocianinas, flavan-3-óis, flavanonas, flavonóis e flavonas são de grande interesse biológico (White et al., 2010).

Estes metabólitos secundários mostraram, em diferentes graus, potente capacidade antioxidante *in vitro*, relacionado com a capacidade de inibir a peroxidação lipídica (Vinson e Dabbagh, 1998), proteger contra a oxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL) (Fuhrman et al., 1995), reduzir a agregação

plaquetária (Renaud e Delorgeril, 1992) e reforçar a vasodilatação (Fitzpatrick et al., 1993).

Alguns estudos relatam a presença de atividade antioxidante em algumas espécies de *Ficus*, correlacionando esta atividade com a mistura de compostos fenólicos presentes nestas plantas (Al-Fatimi et al., 2007; Daniel et al., 1998; Manian et al., 2008; Shukla et al., 2004; Abdel-Hameed, 2009).

Existem, na literatura, diversos métodos para avaliar a atividade antioxidante de uma mistura de compostos ou de substâncias químicas purificadas. Devido à complexidade dos compostos químicos presentes em extratos vegetais, faz-se necessário a avaliação da capacidade antioxidante da planta por pelo menos dois métodos (Negri et al., 2009).

O sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico é uma das metodologias comumente utilizadas para avaliação antioxidante de produtos naturais. Este método consiste em um ensaio espectrofotométrico baseado na oxidação (descoloração) do  $\beta$ -caroteno induzida pelos produtos da degradação oxidativa do ácido linoleico, ou seja, o método avalia a atividade de inibição de radicais livres gerados durante a peroxidação do ácido linoleico (Marco, 1968; Miller, 1971). Além deste método, outra metodologia comumente utilizada é o método de captura do radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) (PM = 394,3). Este método utiliza o radical estável DPPH que sofre redução pelos antioxidantes com mudança de coloração violeta para amarela, proporcional à concentração da substância redutora da amostra (Figura 5). A diminuição de absorvância indica aumento da atividade sequestradora do radical livre DPPH da substância em teste (Blois, 1958; Choi et al., 2002).

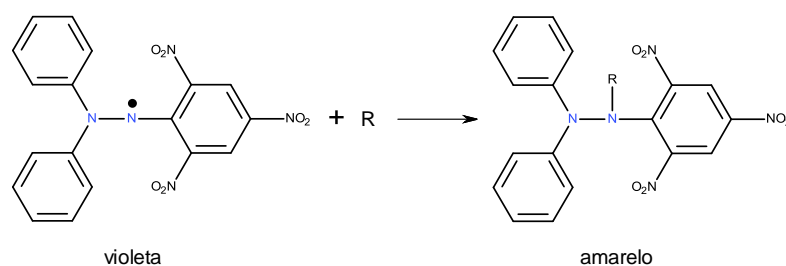


Figura 2. Esquema de reação química mostrando a estabilização do radical livre DPPH.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Realizar prospecção de extratos obtidos a partir de amostras de folhas de quatro espécies de figueiras brasileiras (*Ficus obtusiuscula*, *Ficus adhatodifolia*, *Ficus nevesiae*, *Ficus pulchella*), bem como avaliar as ações antioxidante, mutagênica e genotóxica destes extratos.

#### 3.2 Objetivos Específicos

- Realizar prospecção fitoquímica por cromatografia em camada delgada dos principais grupos de metabólitos secundários que compõem os extratos vegetais;
- Avaliar *in vitro* a atividade antioxidante dos extratos vegetais pelo método de Captura do Radical Livre DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) e Sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico;
- Avaliar as ações mutagênica e genotóxica dos extratos pelos testes *Salmonella*/Microsoma e Clivagem Plasmidial respectivamente.

### 4 METODOLOGIA

#### 4.1 Coleta e identificação do material vegetal

Foram realizadas coletas de folhas das espécies de *Ficus* nos estados do Rio de Janeiro e Minas Gerais conforme indicado na Tabela 1 e Figura 3:

Tabela 1. Local de coleta das espécies de *Ficus*

Nome científico	Município	UF	Coordenadas Geográficas
<i>Ficus pulchella</i> Schott ex Spreng.	Casimiro de Abreu	RJ	W -42°00'42" S -22°32'35"
<i>Ficus nevesiae</i> Carauta	Arraial do Cabo	RJ	W -42°13'19" S -22°56'10"
<i>Ficus adhatodifolia</i> Schott ex Spreng.	Viçosa	MG	W -42°52'23" S -20°45'57"
<i>Ficus obtusiuscula</i> (Miq.) Miq.	Viçosa	MG	W -42°58'05" S -20°40'59"

As coletas foram realizadas pelos botânicos Victor Peçanha de Miranda Coelho e Pedro Paulo de Souza da Universidade Federal de Viçosa em parceria com o Instituto de Botânica de São Paulo. A identificação das espécies foi realizada pelo Dr. Sergio Romaniuc Neto do Instituto de Botânica de São Paulo (IBT-SP). Para servir como material de testemunho, parte das amostras coletadas foram herborizadas e depositadas no Herbário VIC da Universidade Federal de Viçosa.



Figura 3. Localização geográfica de coleta das espécies de *Ficus*.

#### 4.2 Secagem do material vegetal e obtenção dos extratos secos

As folhas das espécies coletadas foram separadas e secadas em estufa ventilada a 39 °C, sendo posteriormente pulverizadas em moinho de facas e armazenadas.

Os extratos aquosos foram preparados por infusão, na proporção de 1:20 (relação droga:solvente). Para esse procedimento, foram pesados 50g de droga vegetal finamente pulverizada, sendo em seguida transferidas para Erlenmeyer de vidro, sendo vertida água destilada fervente. A droga vegetal foi deixada em contato com o solvente durante 15 minutos, sob agitação. Após este procedimento, o material foi filtrado, empregando Kitasato com papel de filtro sob vácuo. Os extratos obtido foram acondicionados em freezer a -80 °C e posteriormente levados ao liofilizador, obtendo-se, ao final, os extratos secos que foram empregados no presente estudo.

### **4.3 Prospecção fitoquímica**

Foi investigada a presença de metabólitos secundários das seguintes classes nos extratos: cumarinas, alcalóides, triterpenos/esteróides, flavonóides, taninos e saponinas.

As cromatografias em camada delgada foram realizadas seguindo as metodologias descritas por Wagner (1996) e Harbone (1984) com adaptações, utilizando cromatofolhas com fase estacionária sílica-gel F254 (Merk<sup>®</sup>), diferentes fases móveis, empregando reveladores específicos para cada grupo de metabólito secundário. Em alguns casos, para visualização do cromatograma foram empregadas luzes de comprimento de onda nas regiões de 254 e 365 nm. Os resultados obtidos pela cromatografia foram confrontados com padrões de referência (Tabela 2).

### **4.4 Quantificação de polifenóis totais**

A concentração de polifenóis totais foi determinada pelo método colorimétrico Folin-Ciocalteu utilizando padrão de ácido tânico.

O reagente de Folin-Ciocalteu é uma mistura de óxido de molibdênio ( $\text{MoO}_3$ ), tungstato de sódio ( $\text{Na}_2\text{WO}_4$ ) e ácido fosfórico ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) que pode ser preparado ou adquirido comercialmente. O mecanismo da reação de oxidação entre os compostos polifenólicos e o reagente de Folin-Ciocalteu não é totalmente compreendido. O cromóforo de cor azulada produzido é um complexo fosfomolibidênico- fosfotunguístico quantificado em 760 nm. A reação é feita em meio básico e necessita de 30 minutos para se completar.

Foram pesados 20 mg de extrato seco em um béquer, adicionado 50 mL de água destilada. Destas soluções, foi retirada uma alíquota de 4 mL, e vertida para balão volumétrico de 50 mL, sendo o volume completado com água destilada.

Foi preparada uma solução de carbonato de sódio a 15% (15 g de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> e 100 mL de água destilada) que atua estabilizando a reação.

Em tubos de ensaios foram adicionados 8,5 mL da solução amostra de extrato seco, 1 mL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> e por último 0,5 mL de reagente de Folin-Ciocalteu (Dinâmica).

O branco foi preparado, utilizando 8,5 mL de água destilada em substituição da solução de amostra da droga vegetal. As reações foram realizadas em triplicata. Os tubos de ensaio foram agitados e mantidos ao abrigo da luz para reação por 30 minutos.

Em seguida, foram tomadas leituras a 760 nm em espectrofotômetro UV-1600 Pró-Analise.

Para quantificação dos polifenóis foi empregada uma curva padrão com solução de ácido tânico (CRQ) nas seguintes concentrações: 10, 20, 30, 40, 50 e 60 µg/mL. Foi calculado um coeficiente de correlação. O resultado da quantificação foi expresso em Equivalentes Ácido Tânico por grama de extrato seco (EAT/g).

Tabela 2. Fases móveis, reveladores e padrões de referência utilizados para prospecção fitoquímica dos extratos secos das espécies de *Ficus*.

Metabólito secundário	Fase móvel/revelador	Padrão de referência
Cumarina	acetato de etila:metanol:água (100:17:13)/KOH 10% em etanol	<i>F. carica</i> e Venalot®
Alcalóides	acetato de etila:metanol:água (100:14:10)/ Reagente de Drangendorff	Quinina
Triterpenos e esteróides	tolueno:eter:ácido acético 10% (45:45:10)/ reagente de Lieberman Burchard	β-sitosterol
Heterosídeos flavônicos	acetato de etila:ácido fórmico:ácido acético glacial:água (55:5:5:12)/ AlCl <sub>3</sub> 5% em metanol	Rutina
Geninas Flavônicas	clorofórmio:acetato de etila (60:40) / AlCl <sub>3</sub> 5% em metanol	Quercetina
Taninos	tolueno:butanol:ácido acético:água (50:25:25:5)/ K <sub>3</sub> Fe(CN) <sub>6</sub> 1% e FeCl <sub>3</sub> 2% (1:1)	Ácido pirogálico
Saponinas	clorofórmio:ácido acético glacial:metanol:água (15:8:3:2)/ Anisaldeído 100 °C	Aescina

#### 4.5 Avaliação antioxidante total pelo sistema $\beta$ -caroteno/ácido linoleico

Para a preparação da emulsão  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico, foram dissolvidos 2 mg de  $\beta$ -caroteno (Fluka) em 10 mL de clorofórmio (Vetec) e misturados a 250  $\mu$ L de ácido linoléico (Vetec) e 1,835 mL de Tween 20 (Vetec). O clorofórmio foi removido em rota-evaporador 50 °C por 5 minutos. Foram adicionados 500 mL de água destilada aerada por 30 minutos foi adicionada ao resíduo semi-sólido e agitado vigorosamente para formar a emulsão.

Uma alíquota de 5 mL da emulsão foi adicionada em tubos contendo 1 mL dos extratos avaliados a 100  $\mu$ g/mL. As absorvâncias foram imediatamente medidas a 470 nm em um espectrofotômetro UV-1600 Pró Análise, usando um branco consistido da água destilada. O controle foi feito com 5 mL de emulsão e 1 mL de água destilada. Também foi avaliado o potencial antioxidante do butil hidroxitolueno (BHT), uma substância sintética conhecidamente antioxidante a título de comparação. Por ser praticamente insolúvel em água, foi preciso analisar o potencial antioxidante do BHT (Vetec) frente a outro Controle, usando o mesmo solvente (metanol) utilizado para sua diluição.

Após a primeira leitura considerada o tempo inicial (zero) os tubos de ensaio foram colocados em banho-maria a 50 °C e a absorvância monitorada com intervalos de 20 min até 120 min.

A porcentagem de atividade antioxidante total das amostras foi avaliada em termos de diminuição das absorvâncias comparadas ao controle, usando a seguinte fórmula:

$$AA = \left(1 - \frac{A_0 - A_t}{A_{0_0} - A_{0_t}}\right) \times 100 \quad (1)$$

onde AA é Atividade Antioxidante,  $A_0$  a absorvância inicial da amostra,  $A_t$  a absorvância da amostra após 120 min,  $A_{0_0}$  a absorvância inicial do controle e  $A_{0_t}$  a absorvância do controle após 120 min.

Foram realizadas análises estatísticas entre as médias das absorvâncias espectrofotométricas, que correspondem à inibição da oxidação de cada extrato seco e BHT, utilizando a análise de variância ANOVA e o teste de médias de Tukey.

Foi calculado o coeficiente de correlação de Pearson ( $P < 0,05$ ) entre o teor de polifenóis totais e a atividade antioxidante avaliada por este método para as quatro espécies de *Ficus* estudadas.

#### 4.6 Avaliação antioxidante pelo método de captura do radical livre DPPH

Este ensaio foi realizado como descrito por Shirwaikar et al. (2006) com modificações. Foi realizado um ensaio espectrofotométrico utilizando uma solução de DPPH 0,01 mM em metanol (Vetec). A cada 2 mL da amostra dos extratos (concentrações 25, 75, 125, 175, 225 µg/mL) foi adicionado 2 mL da solução de DPPH (Sigma). Após 30 minutos de incubação no escuro, as absorbâncias das soluções foram medidas a 517 nm em espectrofotômetro UV-1600 Pró Analise previamente zerado com um branco constituído de 2 mL de amostra de cada extrato na maior concentração (225 µg/mL).

Foi constituída uma solução controle com 2 mL de DPPH diluído em 2 mL de metanol. Como base de comparação entre o potencial antioxidante das amostras foi utilizado o antioxidante butil hidroxitolueno (BHT).

A atividade sequestradora de radical livre DPPH (diminuição da absorbância) de cada amostra foi calculada de acordo com a equação:

$$\% \text{ captura de radical livre DPPH} = \left( 1 - \frac{A_{\text{amostra}}}{A_{\text{controle}}} \right) \times 100 \quad (2)$$

Onde:  $A_{\text{amostra}}$  e  $A_{\text{controle}}$  são as absorbâncias das amostras e do controle.

A concentração da amostra necessária para inibir 50% do radical livre DPPH ( $IC_{50}$ ) foi estimada pela equação da reta.

Também foram analisadas estatisticamente as médias das absorbâncias espectrofotométricas, que correspondem à percentagem de inibição da oxidação para cada extrato seco e dose testada, além do BHT, utilizando a análise de variância ANOVA e o teste de médias de Tukey.

## 4.7 Testes de mutagenicidade

Para avaliação das potenciais atividades mutagênicas dos extratos secos de *Ficus pulchella*, *Ficus adhatodifolia* e *Ficus obtusiuscula* foi empregado o teste microssomal com *Salmonella typhimurium*, conhecido como teste de Ames, com e sem ativação metabólica.

### 4.7.1 Controles positivos e linhagens de *S. typhimurium*

As linhagens de *S. typhimurium* empregadas no teste derivam da parental LT2, auxotróficas para histidina (His<sup>-</sup>), apresentando diferentes mutações no operon deste aminoácido, sendo construídas para detectar mutações do tipo deslocamento do quadro de leitura ou substituição de pares de base no DNA. Essas linhagens são incapazes de crescer em meio de cultura mínimo, sem histidina, a menos que ocorram mutações que restaurem a sua capacidade de síntese. O número de revertentes é facilmente medido, pela contagem de colônias que crescem em meio mínimo, após a exposição de uma população de células à substância a ser testada.

Foram utilizadas as linhagens TA97a, TA98, TA100 e TA102 de *Salmonella typhimurium*. A linhagem TA97 apresenta mutação *hisD6610* e detecta substâncias que causam erro no quadro de leitura, tendo uma citosina adicional em sequência de seis citosinas no sítio de mutação. TA97 possui um segundo sítio para mutação em pares de bases GC, sendo sensível a compostos que revertem TA1538 e TA98 (Levin et al., 1982a).

A cepa TA98 apresenta mutação no gene *hisD3052* que codifica para a enzima histidinol desidrogenase (EC 1.1.1.23), 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.

TA100 apresenta mutação em *hisG46* que codifica a primeira enzima do processo de biossíntese da histidina, a ATP fosforibosiltransferase (EC 2.4.2.17), 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 GC (Maron e Ames, 1983).

A TA102 de *S. typhimurium* contém AT no sítio de mutação *hisG428* e este sítio está inserido no plasmídeo multicópia pAQ1. A TA102, por ser proficiente em

mecanismos de reparo, ainda detecta agentes mutagênicos oxidativos, incluindo bleomicina, peróxido de hidrogênio e mitomicina C (Levin et al., 1982b).

A Tabela 3 resume as características das linhagens que foram utilizadas nos testes mutagênicos.

Tabela 3. Características genéticas das linhagens de *S. typhimurium* mais comumente utilizadas no ensaio de mutagenicidade.

Linhagem	Mutação <i>his</i>	Tipo de mutação	Alvo de mutação
TA97a	<i>hisD6610</i>	Deslocamento do quadro de leitura	GC
TA98	<i>hisD3052</i>	Deslocamento do quadro de leitura	GC
TA100	<i>hisG46</i>	Substituição de pares de base	GC
TA102	<i>hisG428</i>	Substituição de pares de base	AT

Como controles positivos foram utilizados compostos mutagênicos em concentrações definidas como descrito na Tabela 4:

Tabela 4. Controles positivos utilizados no ensaio de mutagenicidade para diferentes linhagens de *S. typhimurium*.

Linhagem	Controle S9-	Dose µg/placa	Controle S9+	Dose µg/placa
TA97a	9-aminoacridina	50	2-aminoantraceno	1-5
TA98	4-nitro-o-fenilenodiamino	2,5	2-aminoantraceno	1-5
TA100	Azida sódica	5	2-aminoantraceno	1-5
TA102	Mitomicina C	0,5	2-aminoantraceno	5-10

#### 4.7.2 Verificação das características genéticas das cepas de *S. typhimurium*

As características genéticas das cepas de *S. typhimurium* foram checadas rotineiramente, antes do preparo dos estoques para congelamento. A dependência da histidina, presença de mutação *rfa*, presença de deleção *uvrB*, presença de plasmídeos de resistência e taxa de reversão espontânea foram verificadas de acordo com Maron e Ames (1983).

### **4.7.3 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 (Vetec), 15 g de Bacto ágar (Himedia) e 930 mL de água destilada; e Meio Vogel Bonner “E” 50x concentrado: 10 g de sulfato de magnésio heptahidratado (Vetec), 100 g de ácido cítrico (Vetec), 175 g de fosfato de sódio e amônio (Vetec), 500g de fosfato de potássio dibásico (Vetec) e 670 mL de água destilada; na proporção de 980 mL para 20 mL, respectivamente.

O ágar de superfície (“top ágar”) foi composto por 0,5 g de cloreto de sódio (Vetec), 0,6g de Bacto ágar e 100 mL de água destilada, acrescido de 10 mL de uma solução de L-histidina 0,096 mg/mL (Vetec) e D-biotina 0,123 mg/mL (Inlab). Os meios de cultura foram preparados e esterilizados em autoclave a 121 °C por 30 minutos.

Como controle negativo foi utilizado água autoclavada, o solvente empregado para ressuspensão dos extratos secos. Como controles positivos foram usados 4-nitro-*o*-fenilenodiamino (Aldrich) 50 µL (TA97a e TA98), azida sódica (Vetec) 25 µL (TA100), mitomicina C (Bristol Meyers) 2 µL (TA102), em ausência de S9 e 2-aminoantraceno (Vetec) 25 µL (TA97a, TA98 e TA100), 2-aminoantraceno 30 µL (TA102), em presença de S9 (Moltox).

### **4.7.4 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 0,2 M pH 7,4, 0,1 mL de cultura de bactérias com  $0,2 \times 10^8$  bactérias/mL e incubadas a 37 °C por 30 minutos. Decorrido o tempo de incubação, 2 mL de “top ágar”, contendo traços de L-histidina e D-biotina, foram adicionados a 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. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

#### **4.7.5 Análise dos resultados mutagênicos**

Os dados de mutagenicidade dos extratos secos foram analisados utilizando a análise de variância ANOVA e o teste de Tukey entre as médias do número de revertentes nas diferentes doses testadas e o controle negativo, seguido de uma regressão linear.

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 positivas para atividade mutagênica quando seu RM foi maior ou igual a dois em pelo menos uma das doses testadas e quando houve correlação dose-resposta ( $R^2 \geq 0,8$ ) entre as concentrações testadas e o número de revertentes induzidos. Por outro lado, a amostra foi considerada negativa para atividade mutagênica quando não induziu aumento significativo no número de revertentes His<sup>+</sup> e seu valor RM foi menor que dois para todas as doses testadas. Quando somente um dos critérios foi atingido, considerou-se que a amostra apresentou indícios de mutagenicidade.

#### **4.7.6 Considerações de segurança**

A linhagem selvagem de *Salmonella typhimurium* apresenta patogenicidade ao ser humano e é capaz de causar intoxicação alimentar e diarreia. Porém, as linhagens utilizadas no teste de Ames apresentam mutações, *rfa* e *gal*, que tornam estas células não patogênicas, já que são desprovidas da camada de polissacarídeo que reveste a superfície bacteriana.

Contudo, procedimentos básicos de um laboratório de microbiologia e técnicas assépticas foram utilizados a fim de minimizar a exposição às cepas de *S. typhimurium* (Mortelmans et al., 2000).

#### **4.7.7 Teste de citotoxicidade**

A dose máxima de extrato a ser testada foi determinada pela solubilidade do extrato seco em água e ficou fixada em 150 mg/mL. Para determinar a citotoxicidade

a *Salmonella typhimurium* dos extratos secos das espécies *F. pulchella*, *F. adhatodifolia* e *F. obtusiuscula* foi utilizado a linhagem TA100 sem uso do fator S9, de acordo com Stankevics et al. (2008), com algumas modificações.

A cultura de bactéria a uma densidade de  $0,4 \times 10^8$  bactérias/mL foi diluída até a densidade  $0,4 \times 10^2$  bactérias/mL. Uma alíquota de 100 µL de extrato na concentração de 150 mg/mL foi adicionada a 500 µL de tampão fosfato 0,2 M pH 7,4 e 100 µL de cultura de bactéria em um tubo de ensaio. Os tubos assim preparados foram incubados a 37 °C por 30 minutos. Após o período de incubação foi adicionado 2 mL de ágar de superfície, composto por ágar e cloreto de sódio, e misturado em vortex. O conteúdo de cada tubo foi vertido em placas contendo ágar mínimo glicosado (AMG) e meio Vogel Bonner “E” 50X concentrado, enriquecido com histidina e biotina. As placas foram então incubadas a 37 °C por 24 horas e o número de colônias crescidas foi contado. O experimento foi realizado em triplicata.

O número médio de colônias crescidas nas placas tratadas com os extratos secos foi comparado frente a um controle negativo (sem extrato), utilizando a análise de variância ANOVA e o teste de médias de Tukey. Doses de extratos que inibam o crescimento de colônias em mais de 30% quando comparadas com o controle negativo são consideradas citotóxicas (Stankevics et al., 2008).

#### **4.8 Testes de genotoxicidade**

Na avaliação do potencial genotóxico dos extratos vegetais, foi utilizado o teste de clivagem plasmidial. Para a realização deste teste foi utilizado o plasmídeo multicópia pUC18, de *Escherichia coli* que possui 2,7 kb com marca de seleção para ampicilina. O pUC18 foi extraído de *E. coli* DH5α pelo método de lise alcalina (Sambrook et al., 1989). Em seguida, 20 µg de DNA plasmidial foram incubados com diferentes concentrações de extratos, por 1 hora a 37 °C.

O princípio deste teste baseia-se na técnica de análise de DNA por eletroforese, onde a molécula de DNA, por possuir carga negativa em pH neutro ou alcalino, migra para o polo positivo quando submetida a um campo elétrico. A velocidade de migração do DNA depende do tamanho da molécula.

Assim, uma alíquota de 20 µL foi aplicada em gel com matriz de agarose (Himedia) 0,8% em tampão TBE (Tris-borato-EDTA) 1X, pH 8,3, previamente corado com brometo de etídio (Sigma) 1 µg/mL. Esse corante se intercala entre as

bases dos ácidos nucleicos e, na presença de luz Ultra Violeta (entre 260 e 360 nm), fluoresce em vermelho alaranjado. Como controle positivo foi utilizado o cloreto de estanho (Vetec). O controle negativo foi o DNA tratado com água destilada. A comparação entre as bandas de DNA incubado com o extrato e com as bandas dos controles positivo e negativo foi usada para diagnosticar possível ação genotóxica dos extratos.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Coleta e Identificação do Material Vegetal

As espécies de *Ficus* coletadas foram identificadas e depositadas em exsicatas no Herbário VIC da Universidade Federal de Viçosa conforme a Tabela 5:

Tabela 5. Exsicatas das quatro espécies de *Ficus* depositadas no Herbário VIC.

Espécie	Data de Coleta	Exsicata
<i>Ficus pulchella</i> Schott ex Spreng.	02/11/2010	*
<i>Ficus obtusiuscula</i> (Miq.) Miq.	08/08/2007	VIC 31713
<i>Ficus nevesiae</i> Carauta	02/11/2010	*
<i>Ficus adhatodifolia</i> Schott ex Spreng.	04/10/2007	VIC 31644

\* No momento da coleta não apresentaram material fértil para incorporação em herbário. Será obtida posteriormente.

### 5.2 Obtenção dos extratos

Os extratos secos provenientes das folhas de espécies de *Ficus* obtidos após a liofilização dos extratos aquosos foram pesados, sendo calculado o rendimento (Tabela 6).

Tabela 6. Rendimento dos extratos secos das folhas de espécies de *Ficus*.

Espécie	Quantidade de droga vegetal (g)	Extrato seco liofilizado (g)	Rendimento do extrato seco (%)
<i>F. pulchella</i>	50	5,8	11,6
<i>F. obtusiuscula</i>	50	3,8	7,6
<i>F. nevesiae</i>	50	6,7	13,4
<i>F. adhatodifolia</i>	50	2,4	9,8

A extração dos componentes das folhas de *Ficus* foi seletiva para compostos mais polares, uma vez que foi utilizada água como solvente extrator. Este método de extração foi escolhido de forma a aproximar ao modo de uso dessas plantas na medicina popular. O processo de liofilização para obtenção dos extratos secos é um método que garante um maior período de conservação dos extratos e manutenção da integridade dos compostos químicos.

### 5.3 Prospecção Fitoquímica

A prospecção fitoquímica do extrato seco das folhas de espécies de *Ficus*, realizada por Cromatografia em Camada Delgada (CCD), estão apresentados na Tabela 7. Os resultados mostram a variedade de grupos de metabólitos secundários encontrados e ainda a semelhança do perfil fitoquímico entre as espécies.

Tabela 7. Resultados da prospecção fitoquímica, por cromatografia de camada delgada, dos extratos secos de quatro espécies de *Ficus*.

Classe de metabólito secundário	Extratos secos			
	<i>F. pulchella</i>	<i>F. obtusiuscula</i>	<i>F. nevesiae</i>	<i>F. adhatodifolia</i>
Cumarinas	-	+	+	+
Alcalóides	-	-	-	-
Triterpenos e esteróides	-	-	-	-
Heterosídeos flavônicos	+	+	+	+
Geninas flavônicas	-	-	-	-
Taninos	+	+	+	+
Saponinas	-	-	-	-

+: positivo; -: negativo.

O gênero *Ficus* tem sido alvo de estudos de diversos pesquisadores e a avaliação do perfil fitoquímico das folhas de espécies deste gênero tem revelado substâncias (Darbour et al., 2007) de variadas classes de metabólitos secundários, como flavonóides (Wu et al., 2002), triterpenos (Li et al., 2006), alcalóides (Yang et al., 2006), cumarinas (Chang et al., 2005) e taninos (Singh et al., 2011).

#### 5.4 Quantificação de polifenóis totais

A Tabela 8 mostra a concentração de polifenóis totais, em Equivalentes Ácido Tânico por grama de extrato seco (EAT/g), das amostras de quatro espécies de *Ficus*, determinada pelo método colorimétrico com reagente de Folin-Ciocalteu:

Tabela 8. Concentração de polifenóis totais nos extratos secos das amostras de *Ficus* analisadas em triplicata e desvio padrão

Extrato seco (espécie de <i>Ficus</i> )	Conteúdo Fenólico (mg EAT/g)
<i>F. pulchella</i>	117,00 ± 0,011 <sup>a</sup>
<i>F. obtusiuscula</i>	127,26 ± 0,005 <sup>a</sup>
<i>F. nevesiae</i>	101,35 ± 0,002 <sup>b</sup>
<i>F. adhatodifolia</i>	82,36 ± 0,001 <sup>c</sup>

EAT (Equivalentes Ácido Tânico). Tratamentos seguidos por uma mesma letra não diferem estatisticamente entre si ao nível P<0,05 pelo teste de Tukey.

A análise estatística revelou que não há diferença significativa entre a concentração de polifenóis totais dos extratos secos de *Ficus pulchella* e *Ficus obtusiuscula*. Os extratos secos de *Ficus nevesiae* e *Ficus adhatodifolia* foram significativamente diferentes entre si e entre os demais extratos.

O teores de compostos fenólicos totais encontrados nos extratos secos das espécies estudadas são próximos aos encontrados na literatura para outras espécies de *Ficus*, como a *F. nitida* (105,38 mg Equivalentes Ácido Gálico/g), *F. lyrata* (131,38 mg EAG/g) e *F. sycomorus* (120,46 mg EAG/g) (Abdel-Hameed, 2009).

#### 5.5 Avaliação antioxidante total pelo sistema β-caroteno/ácido linoleico

O extrato seco de *F. obtusiuscula*, numa concentração de 100 µg/mL, apresentou 39,91% de inibição da oxidação no tempo máximo de 120 minutos, enquanto que a *F. pulchella* apresentou 38,23%, *F. nevesiae* 37,97% e *F. adhatodifolia* 36,16%, todas na mesma concentração e intervalo de tempo (Figura 4). No entanto, a análise estatística mostrou que não houve diferença significativa (P<0,05) entre a capacidade antioxidante dos extratos secos analisados pelo sistema β-caroteno/ácido linoleico, o que mostra a similaridade entre as espécies do mesmo gênero. A análise do potencial antioxidante do BHT (Figura 5) numa concentração de 75 µg/mL inibiu 80% da oxidação no tempo máximo de 120 minutos pelo sistema β-caroteno/ácido linoleico.

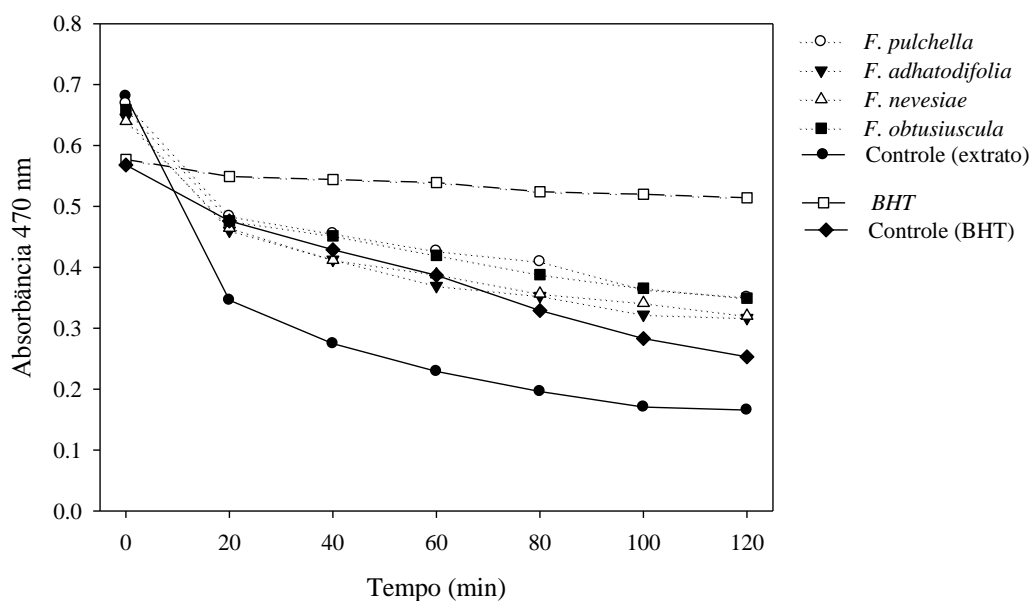


Figura 4. Comparação da atividade antioxidante dos extratos secos de folhas de espécies de quatro espécies de *Ficus* (100 µg/mL) e BHT (75 µg/mL) analisadas pelo Sistema β-caroteno/ácido linoleico.

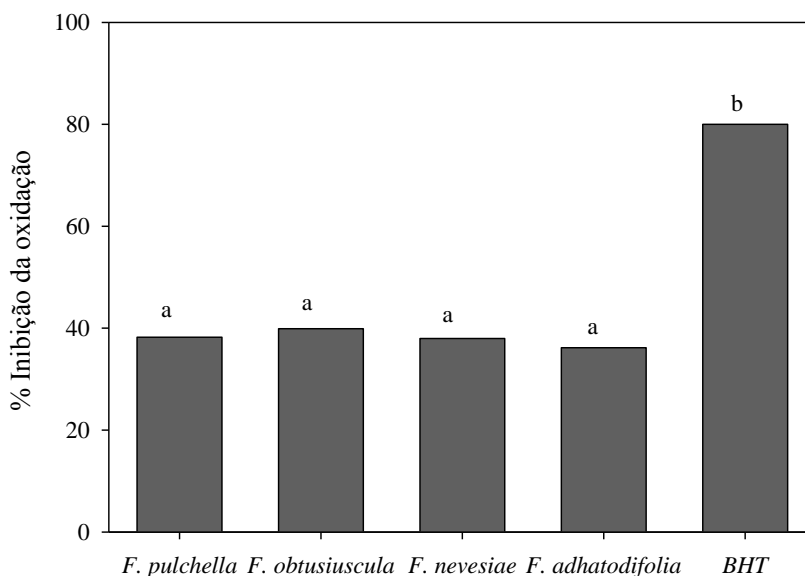


Figura 5. Porcentagem de inibição da oxidação dos extratos secos (100 µg/mL) de quatro espécies de *Ficus* e BHT (75 µg/mL) analisadas pelo Sistema β-caroteno/ácido linoleico. Tratamentos seguidos por uma mesma letra não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% pelo teste de Tukey.

A correlação entre o conteúdo de polifenóis totais e a capacidade antioxidante tem sido estudada por diversos autores (Cai et al., 2004; Kumaran e Karunakaran, 2006). Estudos têm estabelecido uma correlação positiva, enquanto outros estudos relatam não haver correlação (Yu et al., 2002).

Apesar de capacidade antioxidante dos extratos secos não se diferenciarem entre si estatisticamente, o coeficiente de correlação de Pearson ( $P < 0,05$ ) entre o teor de polifenóis totais e a capacidade antioxidante avaliada pelo Sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico dos quatro extratos secos estudadas mostrou correlação positiva ( $p = 0,96$ ) (Figura 9), assim como reportado no trabalho de Abdel-Hameed (2009) quando foram avaliadas para seis espécies de *Ficus*.

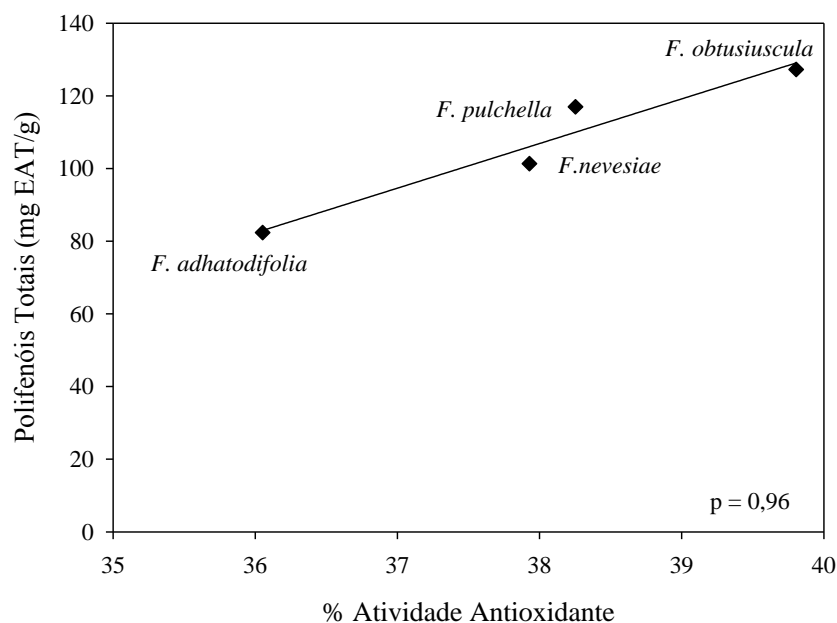


Figura 6. Correlação entre a concentração de polifenóis totais e capacidade antioxidante avaliada pelo Sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico dos extratos secos de folhas de quatro espécies de *Ficus*.

### 5.6 Avaliação antioxidante pelo método de captura do radical livre DPPH

A Tabela 9 mostra os resultados da porcentagem de captura do radical livre DPPH pelos extratos secos analisados. O BHT foi empregado como controle positivo. As atividades antioxidantes dos extratos secos das quatro espécies de *Ficus* foram calculadas estabelecendo uma regressão linear (Figura 7) com base na Tabela 9.

Tabela 9. Porcentagem de captura do radical livre DPPH e desvio padrão do extrato seco das folhas de quatro espécies de *Ficus*.

Extrato aquoso	Dose ( $\mu\text{g/mL}$ )	% Captura DPPH
<i>F. pulchella</i>	25	$15,06 \pm 0,007$
	75	$24,22 \pm 0,005$
	125	$38,45 \pm 0,007$
	175	$43,83 \pm 0,008$
	225	$64,11 \pm 0,007$
<i>F. obtusiuscula</i>	25	$21,49 \pm 0,001$
	75	$40,87 \pm 0,002$
	125	$56,09 \pm 0,009$
	175	$70,85 \pm 0,004$
	225	$80,77 \pm 0,004$
<i>F. nevesiae</i>	25	$18,92 \pm 0,003$
	75	$30,65 \pm 0,006$
	125	$38,91 \pm 0,006$
	175	$46,32 \pm 0,007$
	225	$56,09 \pm 0,002$
<i>F. adhatodifolia</i>	25	$16,81 \pm 0,002$
	75	$32,55 \pm 0,003$
	125	$52,61 \pm 0,010$
	175	$67,37 \pm 0,006$
	225	$81,53 \pm 0,009$
BHT	1	$21,34 \pm 0,01$
	5	$61,17 \pm 0,01$
	10	$82,59 \pm 0,00$
	20	$90,23 \pm 0,00$
	30	$91,90 \pm 0,00$

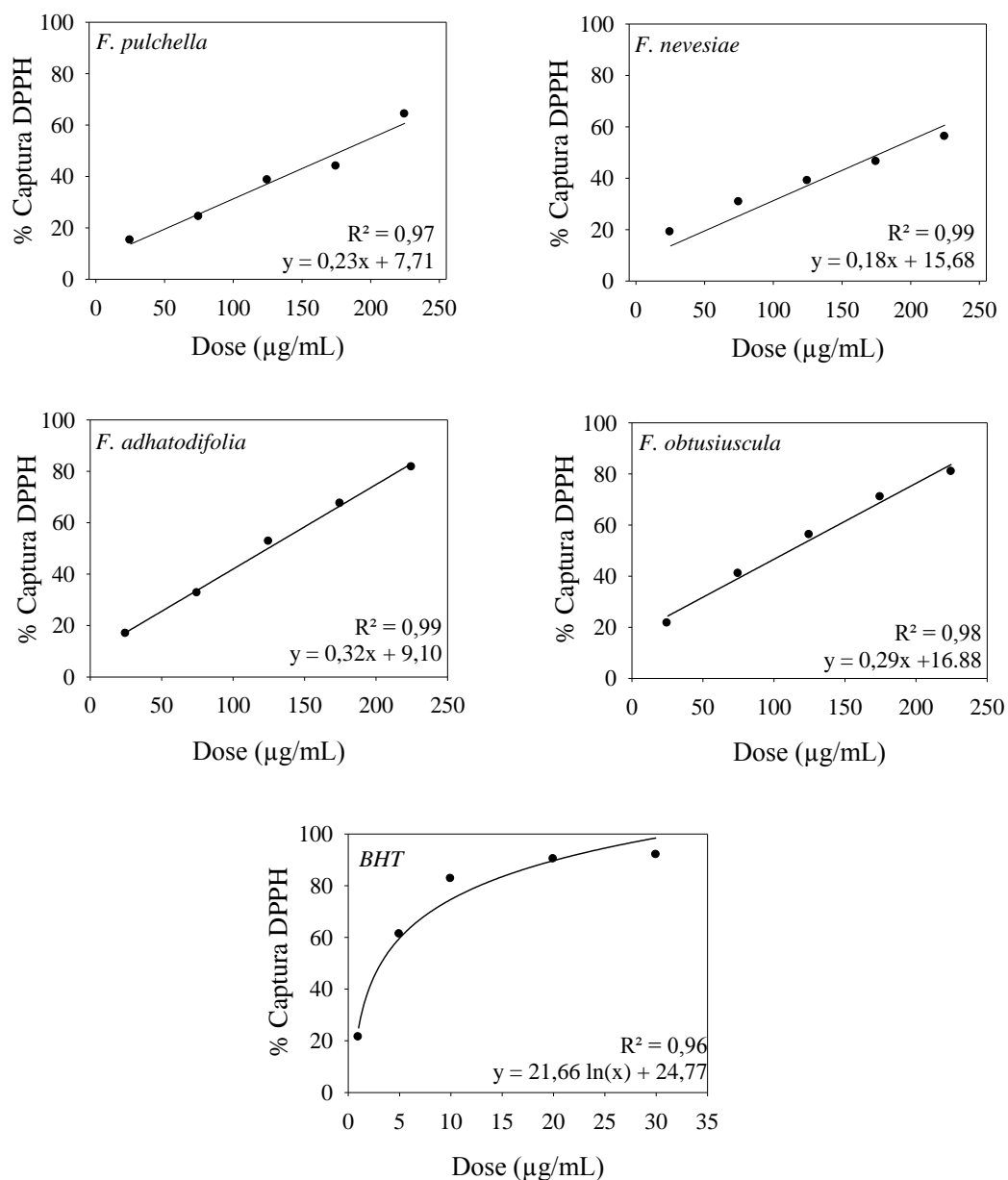


Figura 7. Comparação das curvas obtidas pelo método de captura do radical livre DPPH para cálculo do valor  $\text{IC}_{50}$  dos extratos secos de quatro espécies de *Ficus* e BHT.

Os resultados mostraram o potencial antioxidante das quatro espécies de *Ficus* em ordem decrescente: *F. obtusiuscula* > *F. adhatodifolia* > *F. pulchella* > *F. nevesiae*, com  $\text{IC}_{50}$  de 111,48, 124,68, 179,65 e 190,66  $\mu\text{g/mL}$  respectivamente. Contudo, a análise estatística mostrou não haver diferença significativa ( $P < 0,05$ ) entre o potencial antioxidante dos extratos secos analisados pelo método de captura do radical livre DPPH. O valor  $\text{IC}_{50}$  do BHT foi 3,21  $\mu\text{g/mL}$ .

A Figura 8 mostra comparação entre os valores de IC<sub>50</sub> dos extratos secos, e também o IC<sub>50</sub> calculado para o BHT empregando este mesmo método de avaliação antioxidante.

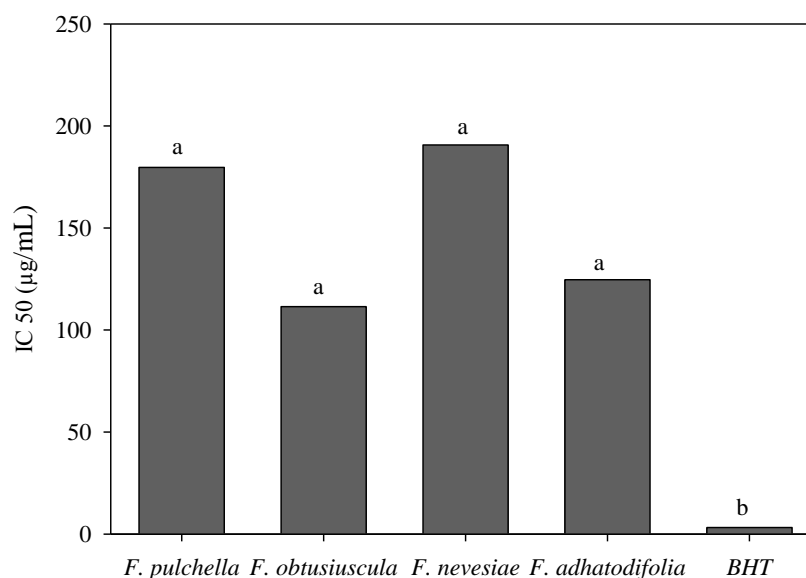


Figura 8. Comparação do valor IC<sub>50</sub> (µg/mL), calculado pelo método de Captura do Radical Livre DPPH, entre os extratos secos das quatro espécies de *Ficus* e BHT. Tratamentos seguidos por uma mesma letra não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% pelo teste de Tukey.

*Ficus obtusiuscula* é a espécie com o maior teor de polifenóis totais (127,26 mg EAT/g) e apresentou o menor valor de IC<sub>50</sub> dentre os extratos secos estudados, ou seja, seu extrato seco possui a maior capacidade antioxidante dentre as espécies estudadas.

## 5.7 Testes de mutagenicidade

Não foram realizados os testes de mutagenicidade e genotoxicidade para a espécie *Ficus nevesiae* devido à escassez de material vegetal. Esta espécie é considerada em perigo EN B1 (Pederneiras et al., 2011).

### 5.7.1 Teste de citotoxicidade

O teste de citotoxicidade mostrou que a dose de 15 mg/placa dos três extratos secos testados não apresentou citotoxicidade para a linhagem TA100 de *Salmonella*

*typhimurium* na ausência do fator S9 (Tabela 10). Quando empregado essa dose observou-se que as cepas tratadas com os extratos secos tiveram média de unidades formadoras de colônias (UFC) estatisticamente igual ao controle negativo ( $P < 0,05$ ). A dose de 15 mg/placa foi determinada pelo limite de solubilidade dos extratos secos em água. Acima dessa dose, houve dificuldade de solubilização das amostras.

Tabela 10. Citotoxicidade expressa pela média de UFC da linhagem TA100 (S9-) de *Salmonella typhimurium* expostas a 15 mg/placa de extratos secos de três espécies de *Ficus* e o controle negativo.

Extrato seco 15 mg/placa	Média de UFC
<i>Ficus pulchella</i>	404,33 ± 7,77 <sup>a</sup>
<i>Ficus adhatodifolia</i>	397,33 ± 8,5 <sup>a</sup>
<i>Ficus obtusiuscula</i>	397 ± 7,94 <sup>a</sup>
Controle negativo	386,67 ± 8,33 <sup>a</sup>

Tratamentos seguidos por uma mesma letra não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% pelo teste de Tukey.

Na literatura existe relato de citotoxicidade de flavonóides como a apigenina, encontrada no caule de *Ficus formosana*, frente a linhagens de células cancerígenas (Sheu et al., 2005). Da mesma forma, alguns triterpenos isolados de raízes aéreas de *Ficus microcarpa* (Chiang et al., 2005) e alcalóides isolados de folhas de *Ficus septica* (Wu et al., 2002), demonstraram citotoxicidade para linhagens de células humanas cancerígenas. No entanto, estes grupos de metabólitos secundários não foram identificados nos extratos do presente trabalho.

Como o resultado do teste citotóxico indicou a não toxicidade dos extratos secos para *S. typhimurium*, na dose de 15 mg/placa, esta foi selecionada para ser usada nos ensaios subsequentes de mutagenicidade.

### 5.7.2 Ensaio de mutagenicidade

A Tabela 11 mostra a média do número de bactérias revertentes antes e após a ativação metabólica dos extratos secos das espécies *Ficus pulchella*, *Ficus adhatodifolia* e *Ficus obtusiuscula*.

Tabela 11. Atividade mutagênica expressa pela média do número de revertentes e desvio padrão nas linhagens TA97a, TA98, TA100 e TA102 de *S. typhimurium* expostas a várias doses dos extratos secos das folhas de três espécies de *Ficus* com (S9+) ou sem (S9-) ativação metabólica.

Extrato/Espécie	Dose mg/placa	Revertentes His+/placa							
		TA97a		TA98		TA100		TA102	
		S9-	S9+	S9-	S9+	S9-	S9+	S9-	S9+
<i>F. pulchella</i>	1,875	949,33 ± 16*	1286,67 ± 144	39 ± 5	55,33 ± 8	190,63 ± 13	197,67 ± 8	259,33 ± 51	105 ± 16
	3,75	1366,66 ± 68*	1088 ± 267	68 ± 12*	68,67 ± 3	142,33 ± 12	200,33 ± 21	281 ± 41	214,67 ± 46*
	7,50	1442,66 ± 122*	1222,67 ± 176	101,67 ± 17*	108,67 ± 37*	155,04 ± 44	239 ± 40	385,33 ± 23	405,67 ± 150*
	11,25	1056 ± 139*	1322,67 ± 111	156 ± 19*	177,33 ± 31*	204,42 ± 32*	264 ± 30	398,33 ± 28*	594 ± 78*
	15	1149,33 ± 405*	1492 ± 105	199,33 ± 16*	259,33 ± 16*	255,62 ± 19*	320,5 ± 34*	427,5 ± 9*	750 ± 98*
<i>F. adhatodifolia</i>	1,875	858,66 ± 157	1256 ± 157	19 ± 3	21 ± 6	151,33 ± 19	130 ± 21	318 ± 13	81 ± 16
	3,75	1040 ± 49*	1220 ± 277	19,67 ± 4	30,67 ± 6	175,33 ± 11	180,33 ± 15	358,67 ± 36	72 ± 8
	7,50	1098,66 ± 170*	996 ± 293	33,33 ± 17	23,33 ± 2	182,5 ± 30	159 ± 24	397,33 ± 49	76,33 ± 11
	11,25	1166,66 ± 307*	1113,33 ± 129	36,67 ± 11	35,33 ± 3*	191 ± 38	171,5 ± 19	442,67 ± 63*	101,67 ± 8
	15	568 ± 34	1325,33 ± 96	34,33 ± 12	43 ± 1*	229 ± 9*	200,5 ± 19*	449,33 ± 39*	118,33 ± 15*
<i>F. obtusiuscula</i>	1,875	722,66 ± 265	994,67 ± 154	20,67 ± 6	29 ± 10	192,33 ± 5	168,33 ± 25	305,33 ± 52	64,33 ± 12*
	3,75	633,33 ± 191	1382,67 ± 173	30,33 ± 7	19,33 ± 2	174,67 ± 20	157,33 ± 12	344 ± 53	83,33 ± 22
	7,50	417,33 ± 36	1573,33 ± 70*	29,67 ± 10	26 ± 6	164,67 ± 39	162 ± 11	368 ± 93	118,33 ± 10
	11,25	608 ± 147	1340 ± 152	33,67 ± 3	39 ± 9	209 ± 6	166 ± 15	370,67 ± 68	139,33 ± 7
	15	710,67 ± 25	1397,33 ± 416	35 ± 4	29,67 ± 8	188 ± 18	162,67 ± 32	274 ± 18	178 ± 18*
<b>Controle negativo</b>		301 ± 10	994,67 ± 66	18,67 ± 4	25,33 ± 6	175 ± 9	169,67 ± 242	240,33 ± 25	42,33 ± 2
<b>Controle positivo</b>		1188 ± 70*	1709,33 ± 106*	165 ± 24*	174 ± 57*	1629,33 ± 237*	538,67 ± 24*	1584 ± 52*	83 ± 11

\* P<0,05 (ANOVA); Controle negativo: H<sub>2</sub>O 0,1 mL; Controles positivos: 4-nitro-*o*-fenilenodiamino 5 µg/placa (TA97a e TA98), azida sódica 5 µg/placa (TA100), mitomicina C 0,5 µg/placa (TA102), e 2-aminoantraceno 5 µg/placa (TA97a+S9, TA98+S9, TA100+S9 e TA102+S9).

O extrato de *Ficus pulchella* apresentou RM maior que dois em todas as doses testadas para a linhagem TA97a sem ativação metabólica (S9-). Após a metabolização o valor de RM do extrato não ultrapassou 1,5 na maior dose testada (15 mg/placa) (Tabela 12). Esses resultados demonstram que a atividade mutagênica desse extrato é reduzida pela ativação metabólica para a linhagem testada. Para linhagem TA98, o extrato seco de *F. pulchella* apresentou  $RM \geq 2$  para maioria das doses testadas e correlação dose-resposta significativo, na presença e ausência de ativação metabólica. Frente a linhagem TA100 houve menor sensibilidade à reversão causada pelo extrato de *F. pulchella* em comparação às linhagens TA97a e TA98, porém, apresentou RM maior que dois para as doses de 11,25 e 15 mg/placa sem ativação metabólica, e correlação dose-resposta significativa (Tabela 13). Com ativação metabólica do extrato seco de *F. pulchella* para TA100 não foi observado valor de  $RM \geq 2$ , no entanto observou-se efeito dose-resposta significativo. Para a linhagem TA102 (S9-) o extrato seco das folhas de *F. pulchella* não apresentou RM maior ou igual a dois, porém foi observada significativa correlação dose-resposta ( $R^2 = 0,89$ ). Para TA102 S9+ todas as doses testadas apresentaram RM maior que dois e correlação dose-resposta significativa ( $R^2=0,99$ ).

O extrato de *F. adhatodifolia* apresentou razão de mutagenicidade superior a dois para a linhagem TA97a (S9-) e possível indício de toxicidade para a dose de 15 mg/placa para esta linhagem. A análise deste extrato com a linhagem bacteriana TA102 mostrou RM de 2,4 e 2,8 para as doses 11,25 e 15 mg/placa respectivamente na presença de ativação metabólica e significativa correlação dose-resposta na presença e ausência de metabolização (Tabela 13). Não foram observados  $RM \geq 2$  para este extrato nas demais linhagens testadas, com ou sem ativação metabólica, entretanto, foi observada correlação significativa para efeito dose-resposta para linhagem TA100 (S9-) (Tabela 13). A análise do extrato de *F. obtusiuscula* mostrou valor de RM maior que dois para linhagem TA97a sem ativação metabólica, enquanto que com ativação metabólica não foi observado RM maior ou igual a dois para todas as doses testadas (Tabela 12). Para a linhagem TA102, o extrato de *F. obtusiuscula* mostrou RM maior que dois para as doses de 7,5, 11,25 e 15 mg/placa com ativação metabólica e efeito dose-resposta significativo. As análises deste extrato com as demais linhagens de *S. typhimurium* mostraram valores de RM inferiores a dois na presença e ausência da simulação de metabolismo e também não foi observado correlação significativa para efeito dose-resposta.

Tabela 12. Atividade mutagênica expressa pela Razão de Mutagenicidade nas linhagens TA97a, TA98, TA100 e TA102 de *S. typhimurium* expostas a várias doses dos extratos secos das folhas de três espécies de *Ficus* com (S9+) ou sem (S9-) ativação metabólica.

Extrato/Espécie	Dose mg/placa	Razão de Mutagenicidade (RM)							
		TA97a		TA98		TA100		TA102	
		S9-	S9+	S9-	S9+	S9-	S9+	S9-	S9+
<i>F. pulchella</i>	1,875	3,15	1,29	2,09	2,18	1,09	1,17	1,08	2,48
	3,75	4,54	1,09	3,64	2,71	1,44	1,18	1,17	5,07
	7,50	4,79	1,23	5,45	4,29	1,80	1,41	1,60	9,58
	11,25	3,51	1,33	8,36	7,00	2,12	1,56	1,66	14,03
	15	3,82	1,50	10,68	10,24	2,85	1,89	1,78	17,72
<i>F. adhatodifolia</i>	1,875	2,85	1,26	1,02	0,83	0,86	0,77	1,32	1,91
	3,75	3,46	1,23	1,05	1,21	1,00	1,06	1,49	1,70
	7,50	3,65	1,00	1,79	0,92	1,04	0,94	1,65	1,80
	11,25	3,88	1,12	1,96	1,39	1,09	1,01	1,84	2,40
	15	1,89	1,33	1,84	1,70	1,31	1,18	1,87	2,80
<i>F. obtusiuscula</i>	1,875	2,40	1,00	1,11	1,14	1,10	0,99	1,27	1,52
	3,75	2,10	1,39	1,63	0,76	0,91	0,93	1,43	1,97
	7,50	1,39	1,58	1,59	1,03	0,94	0,95	1,53	2,80
	11,25	2,02	1,35	1,80	1,54	1,19	0,98	1,54	3,29
	15	2,36	1,40	1,88	1,17	1,07	0,96	1,14	4,20
<b>Controle positivo</b>		3,95	1,72	8,84	6,87	9,31	3,17	6,59	1,96

Tabela 13. Correlação dose-resposta calculada pela regressão linear da média do número de revertentes nas linhagens TA97a, TA98, TA100 e TA102 de *S. typhimurium* expostas à várias doses dos extratos secos de três espécies de *Ficus* com (S9+) ou sem (S9-) ativação metabólica.

Extrato/Espécie	Linhagens de <i>Salmonella typhimurium</i>							
	R <sup>2</sup> TA97a		R <sup>2</sup> TA98		R <sup>2</sup> TA100		R <sup>2</sup> TA102	
	S9-	S9+	S9-	S9+	S9-	S9+	S9-	S9+
<i>F. pulchella</i>	0,008	0,59	0,99	0,97	0,97	0,97	0,89	0,99
<i>F. adhatodifolia</i>	0,13	0,009	0,76	0,72	0,9	0,57	0,93	0,8
<i>F. obtusiuscula</i>	8E-05	0,41	0,72	0,27	0,3	3E-05	0,04	0,99

O extrato seco das folhas de *F. pulchella* apresentou indícios de mutagenicidade para a linhagem TA97a (S9-) e foi considerado não mutagênico para TA97a (S9+). Este mesmo extrato foi mutagênico para linhagem TA98 S9+ e S9- (Tabela 13). Para linhagem TA100 o extrato é considerado mutagênico na ausência de metabolização e possui menor atividade mutagênica frente à ativação metabólica, porém, foi observado efeito dose-resposta significativo ( $R^2 = 0,97$ ) (Tabela 13) o que demonstra que há indícios de mutagenicidade. Para a linhagem TA102 o extrato de *F. pulchella* apresentou indícios de mutagenicidade na ausência de metabolização e considerado mutagênico positivo quando metabolizado. Portanto, o extrato seco de *F. pulchella* induziu os dois tipos de mutações que podem ser detectadas por estas linhagens bacterianas, deslocamento do quadro de leitura e substituição de pares de bases, mostrando ainda a presença de compostos mutagênicos tanto de ação direta, que induzem mutações antes de ser metabolizados, quanto de ação indireta, que necessitam ser ativados para que seus metabólitos promovam mutações.

*F. adhatodifolia* teve seu extrato seco considerado mutagênico apenas para a linhagem bacteriana TA102 (S9+), apresentando indícios de mutagenicidade para TA102 (S9-) e para as linhagens TA97a (S9-) e TA100 (S9-).

Já o extrato seco de *F. obtusiuscula* é considerado mutagênico para linhagem TA102 (S9+) e apresenta indício de mutagenicidade para a linhagem TA97a (S9-). Para as demais linhagens este extrato foi considerado mutagênico negativo.

A metabolização dos extratos diminuiu o potencial mutagênico da *F. adhatodifolia* para as linhagens TA97a e TA100. Da mesma forma aconteceu com o extrato de *F. obtusiuscula* para linhagem TA97a e com o extrato de *F. pulchella* para as linhagens TA97a e TA100.

Tabela 14. Atividade mutagênica positiva, negativa ou indício de mutagenicidade nas linhagens TA97a, TA98, TA100 e TA102 de *S. typhimurium* expostas à várias doses dos extratos secos das folhas de três espécies de *Ficus* com (S9+) ou sem (S9-) ativação metabólica.

Extrato/Espécie	Linhagens de <i>Salmonella typhimurium</i>							
	TA97a		TA98		TA100		TA102	
	S9-	S9+	S9-	S9+	S9-	S9+	S9-	S9+
<i>F. pulchella</i>	±	-	+	+	+	±	±	+
<i>F. adhatodifolia</i>	±	-	-	-	±	-	±	+
<i>F. obtusiuscula</i>	±	-	-	-	-	-	-	+

+: Mutagênico; -: Não Mutagênico; ±: Indício de mutagenicidade.

Foi observado aumento de atividade mutagênica na análise dos extratos secos das três espécies de *Ficus* para a linhagem TA102 com ativação metabólica (Tabelas 11 e 12). A linhagem TA102 detecta mutações do tipo substituições de pares de base, tendo ligações AT como alvo, em contraste com as demais linhagens bacterianas utilizadas nos testes. A TA102 detecta mutágenos oxidativos como raio-x, luz UV, mitomicina C, peróxido de hidrogênio, aldeídos e quinonas (Levin et al., 1982b). Flavonóides como a quercetina têm sido descritas por apresentar atividade mutagênica sem ativação metabólica e ter sua atividade mutagênica aumentada na presença de ativação metabólica. Essa atividade está relacionada com a presença de hidroxila livre no anel B na posição C-3, uma dupla ligação entre C2-C3 e um grupo ceto na posição C-4. Baseado nesses requisitos foi proposta a via metabólica para que o flavonóide seja ativo e interaja com o DNA. Para a quercetina, o processo pode incluir oxidação enzimática ou química a quercetina *orto*-quinona, seguida de isomerização da *orto*-quinona a quinona metídica (Rietjens et al., 2005; Moreira et al., 2002). Diversos flavonóides têm sido isolados de folhas de espécies do gênero *Ficus* como: rutina (*F. carica*), isoquercetrina (*F. ruficaulis*), 5-hidroxi-7,5'-dimetoxi-3',4'-metilendioxi-flavona (*F. gomelleira*).

A presença de polifenóis nos extratos secos das espécies de *Ficus* pode estar relacionada à mutagenicidade observada no teste microssomal com *S. typhimurium*. Importante observar que o extrato seco de *F. pulchella* foi considerado mutagênico ou apresentou indícios de mutagenicidade para todas as linhagens de *S. typhimurium* estudadas, e que este extrato apresenta conteúdo fenólico total significativamente

( $P < 0,05$ ) igual ao extrato de *F. obtusiuscula*, que foi considerado mutagênico apenas para TA102 (S9+). Isto indica que a mutagenicidade do extrato seco de *F. pulchella* possivelmente está relacionada a compostos químicos específicos desta espécie.

### 5.8 Teste de genotoxicidade

Os extratos secos de *F. pulchella*, *F. adhatodifolia* e *F. obtusiuscula* foram avaliados quanto ao seu potencial genotóxico através do teste de clivagem plasmidial que utiliza da mudança topológica do DNA em contato com agentes genotóxicos, como por exemplo, o cloreto de estanho ( $\text{SnCl}_2$ ). O objetivo foi avaliar a genotoxicidade dos extratos secos das folhas de espécies de *Ficus* na maior dose de extrato utilizada no teste de mutagenicidade (15 mg).

A Figura 12 mostra os ensaios com DNA plasmidial tratado com os extratos secos com dose de 15 mg. Esta dose foi estabelecida pelo limite de diluição dos extratos secos em água. Não foi possível observar nenhuma das conformações do DNA plasmidial para os extratos secos de *F. pulchella* e *F. obtusiuscula*, fato que motivou a realização de novos ensaios utilizando doses menores de extrato seco. Para o extrato seco *F. adhatodifolia* foi possível visualizar o aparecimento de bandas de DNA plasmidial com redução da conformação superhelicoidal (forma I), caracterizando possível efeito genotóxico.

Foram realizados novos ensaios para os extratos secos das espécies de *Ficus* nas doses de 7,5 mg (Figura 13) e 1 mg (Figura 14). Assim, na Figura 13 mostra indícios de genotoxicidade para os extratos de *F. adhatodifolia* e *F. obtusiuscula*, e não foi observada a presença de bandas plasmidiais para o extrato de *F. pulchella*. Com a diminuição da dose de extrato seco para 1 mg (Figura 14), ainda é possível visualizar potencial ação genotóxica para os extratos de *F. adhatodifolia* e *F. obtusiuscula*, visto que há diminuição da topologia superhelicoidal do plasmidio, quando há comparação com a topologia do DNA plasmidial dos extratos secos com o controle negativo tratado com água destilada. Já para o extrato seco de *F. pulchella* não foi possível a análise genotóxica pela não visualização das bandas de DNA plasmidial.

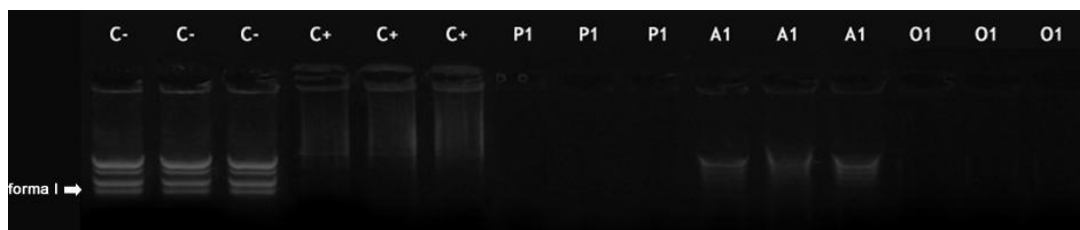


Figura 9. Eletroforese em gel de agarose a 0,8% do plasmídeo pUC18, após tratamento com as seguintes concentrações de **C-**: controle negativo (20 µg DNA pUC18 + 100 µL H<sub>2</sub>O); **C+**: controle positivo (20 µg DNA pUC18 + 750 µg SnCl<sub>2</sub>); **P1**: 20 µg DNA pUC18 + 15 mg extrato *F. pulchella*; **A1**: 20 µg DNA pUC18 + 15 mg extrato *F. adhatodifolia*; **O1**: 20 µg DNA pUC18 + 15 mg extrato *F. obtusiuscula*. Forma I: conformação superhelicoidal.

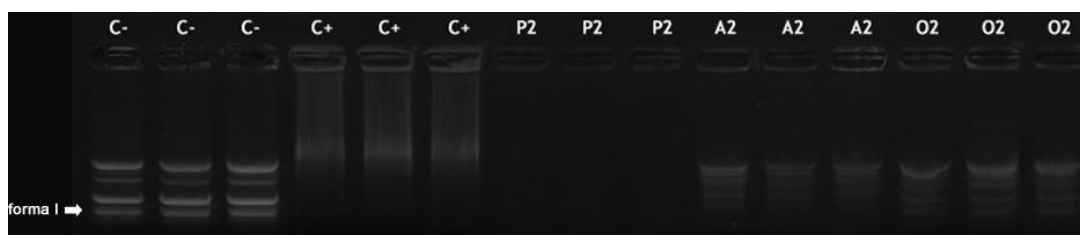


Figura 10. Eletroforese em gel de agarose a 0,8% do plasmídeo pUC18, após tratamento com as seguintes concentrações de **C-**: controle negativo (20 µg DNA pUC18 + 100 µL H<sub>2</sub>O); **C+**: controle positivo (20 µg DNA pUC18 + 750 µg SnCl<sub>2</sub>); **P2**: 20 µg DNA pUC18 + 7,5 mg extrato *F. pulchella*; **A2**: 20 µg DNA pUC18 + 7,5 mg extrato *F. adhatodifolia*; **O2**: 20 µg DNA pUC18 + 7,5 mg extrato *F. obtusiuscula*. Forma I: conformação superhelicoidal.

Assim, a Figura 14 mostra o surgimento de arraste de fragmentos de DNA sem o aparecimento de bandas para o ensaio com extrato seco de *F. pulchella*. Nesse sentido, corridas eletroforéticas para este extrato seco foram realizadas a fim de identificar possíveis ações enzimáticas ou contaminação, presentes neste extrato, o que poderia estar promovendo a degradação do DNA. Assim, amostras do extrato seco de *F. pulchella* foram tratadas com aquecimento a 97 °C por 10 minutos, ampicilina e com EDTA.

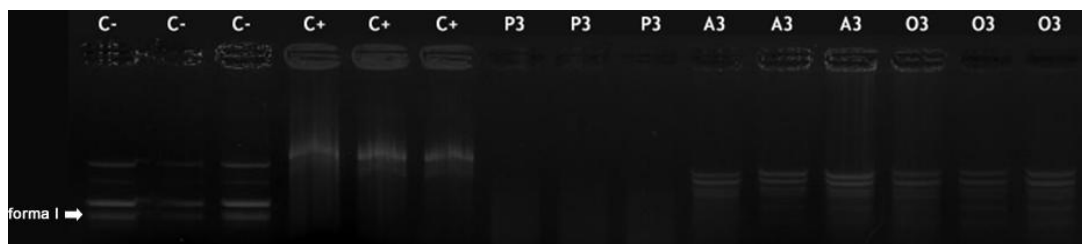


Figura 11. Eletroforese em gel de agarose a 0,8% do plasmídeo pUC18, após tratamento com as seguintes concentrações de **C-**: controle negativo (20 µg DNA pUC18 + 100 µL H<sub>2</sub>O); **C+**: controle positivo (20 µg DNA pUC18 + 750µg SnCl<sub>2</sub>); **P3**: 20 µg DNA pUC18 + 1 mg extrato *F. pulchella*; **A3**: 20 µg DNA pUC18 + 1 mg extrato *F. adhatodifolia*; **O3**: 20 µg DNA pUC18 + 1 mg extrato *F. obtusiuscula*. Forma I: conformação superhelicoidal.

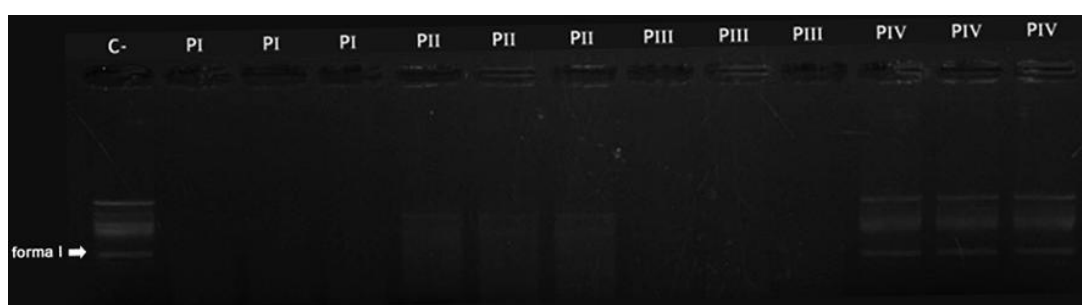


Figura 12. Eletroforese em gel de agarose a 0,8% do plasmídeo pUC18, após tratamento com as seguintes concentrações de **C-**: controle negativo (20 µg DNA pUC18 + 100 µL H<sub>2</sub>O); **PI**: 20 µg DNA pUC18 + 1 mg extrato *F. pulchella*; **PII**: 20 µg DNA pUC18 + 1 mg extrato *F. pulchella* (extrato aquecido a 97 °C por 10 minutos); **PIII**: 20 µg DNA pUC18 + 1 mg extrato *F. pulchella* + 100 µg/mL ampicilina; **PIV**: 20 µg DNA pUC18 + 1 mg extrato *F. pulchella* + 20 µL EDTA 10 mM. Forma I: conformação superhelicoidal.

De acordo com os resultados da Figura 15, observa-se que a amostra tratada com o antibiótico ampicilina teve o mesmo padrão da amostra de extrato sem tratamento, ficando descartada a hipótese de degradação do DNA plasmidial devido a contaminação. Em análises mutagênicas de extratos vegetais pelo teste de Ames a ampicilina é utilizada a fim de evitar contaminações, já que as linhagens de *S. typhimurium* possuem o plasmídeo pKM101 que confere resistência a este antibiótico. A ampicilina foi usada nos testes mutagênicos para o mesmo extrato de *F. pulchella* a fim de se inibir contaminação bacteriana, sendo o resultado satisfatório onde não foi observada contaminação bacteriana.

A presença de bandas de DNA para as amostras tratadas com aquecimento e EDTA (Vetec) suscitou a hipótese de ação enzimática nos extratos de *F. pulchella*, uma vez que enzimas DNAses apresentam sua atividade inibida mediante aquecimento ou uso de agentes quelantes de íons como o EDTA (Baker et al., 1998),

fato que estaria levando ao aparecimento de bandas de DNA plasmidial conforme ocorrido.

Para confirmação da hipótese de presença de ação de DNAses no extrato seco de *Ficus pulchella*, foi realizado novo ensaio com este extrato seco, tratado com 80 µg de proteinase K (Invitrogen), uma protease. O resultado observado na Figura 16 mostrou que este tratamento não modificou o perfil das bandas de DNA plasmidial comparado ao extrato seco não tratado, descartando, dessa forma, a possível presença de atividade enzimática neste extrato seco.

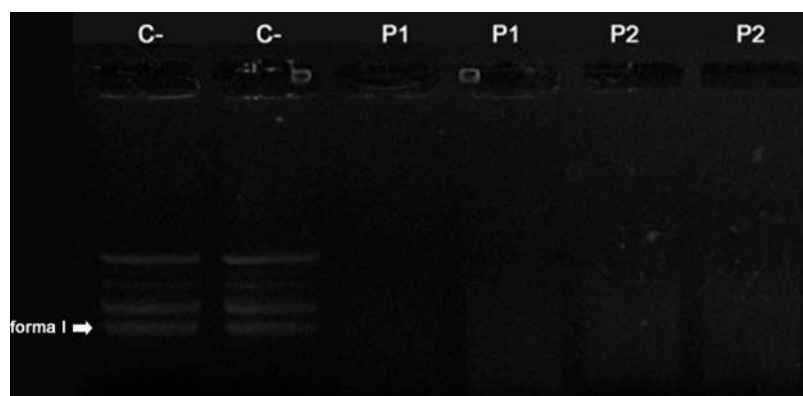


Figura 13. Eletroforese em gel de agarose a 0,8% do plasmídeo pUC18, após tratamento com as seguintes concentrações de **C-**: controle negativo (20 µg DNA pUC18 + 100 µL H<sub>2</sub>O); **P1**: 20 µg DNA pUC18 + 1 mg extrato *F. pulchella*; **P2**: 20 µg DNA pUC18 + 1 mg extrato *F. pulchella* + 80 µg proteinase K. Forma I: conformação superhelicoidal.

A partir dos resultados obtidos, sugere-se que a degradação do DNA plasmidial esteja relacionada com o conteúdo de metabólitos secundários encontrados no extrato aquoso de *F. pulchella*. No teste fitoquímico foi observada a presença das classes de metabólitos secundários de taninos e flavonóides e concentração de polifenóis totais 117,0 mg (EAT/g) pelo método de Folin-Ciocalteu. Estudos relatam que polifenóis, na presença de íons metálicos, como Ca<sup>2+</sup> e Fe<sup>3+</sup>, podem apresentar características pró-oxidantes, serem citotóxicos e genotóxicos (Labieniec et al., 2003). Em um trabalho realizado por Labieniec et al. (2003) foi demonstrado genotoxicidade de polifenóis como taninos frente a células de mamíferos através de avaliação genotóxica pelo teste do cometa que detecta quebras em fitas de DNA.

Segundo Singh et al. (2011), espécies do gênero *Ficus* apresentam folhas ricas em cálcio, fósforo, ferro, cobre, magnésio, manganês, potássio, zinco e sódio.

Assim, uma vez que EDTA age quelando metais, estes não estariam livres para se complexar com os compostos fenólicos presentes no extrato de *F. pulchella*, impedindo, dessa forma, a ação degradante destes metabólitos sobre o DNA plasmidial, conforme observado na Figura 18.

Dessa forma, observa-se indício de genotoxicidade para os extratos de *F. adhatodifolia* e *F. obtusiuscula*, uma vez que houve pequena mudança topológica do DNA plasmidial para o teste destes extratos na dose de 1 mg. Já para o extrato seco da espécie *F. pulchella* não foi possível confirmar sua ação genotóxica, visto que este extrato atuou degradando o DNA, não sendo, assim, possível analisar a conformação topológica do DNA em contato com o extrato. Assim, outros estudos genotóxicos para o extrato seco de *F. pulchella* devem ser realizados a fim de se avaliar seu potencial genotóxico. Contudo, em vista dos resultados obtidos, o uso destes extratos requer cautela, já que eles atuam diretamente sobre o DNA.

## 6 CONCLUSÕES

Os resultados apresentados no trabalho permitem concluir que:

- Os extratos secos das folhas das quatro espécies *Ficus* estudadas mostraram-se como potencial fonte de agentes antioxidantes, tendo sido mostrada uma correlação positiva dessa atividade, analisada pelo sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico, com o teor de polifenóis totais, calculado pelo método de Folin-Ciocalteu, analisados pelo coeficiente de correlação de Pearson.
- Os extratos secos das espécies de *F. pulchella*, *F. adhatodifolia*, *F. nevesiae* e *F. obtusiuscula* apresentam metabólitos secundários das classes de taninos e flavonóides.
- O extrato seco das folhas de *Ficus pulchella* apresentou atividade mutagênica positiva para as linhagens TA98 (S9- e S9+), TA100 (S9-) e TA102 (S9+), e mostrou indícios de mutagenicidade para as linhagens TA100 (S9+) e TA102 (S9-).
- O extrato seco das folhas de *Ficus adhatodifolia* foi considerado mutagênico para linhagem de *S. typhimurium* TA102 (S9+) e apresentou indícios de mutagenicidade para as linhagens TA102 (S9-), TA97a (S9-), TA100 (S9-).

- O extrato seco das folhas de *Ficus obtusiuscula* apresentou efeito mutagênico positivo apenas para linhagem TA102 (S9+) e indícios de mutagenicidade para linhagem TA97a (S9-).
- No teste de clivagem plasmidial, *Ficus pulchella* causou degradação do DNA plasmidial em todas as doses testadas.
- Os extratos secos de *F. adhatodifolia* e *F. obtusiuscula* apresentaram ação genotóxica na dose de 7,5 e 1 mg, indicado pela diminuição da conformação superhelicoidal do DNA plasmidial.
- A detecção de ação mutagênica para as espécies *F. pulchella*, *F. adhatodifolia* e *F. obtusiuscula* e de efeito genotóxico para estas duas últimas dentro das doses avaliadas sugere o uso mais cauteloso dessas espécies na medicina popular, já que eles atuam diretamente sobre o DNA.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdel-Hameed, El-Sayed Saleh. Total phenolic contents and free radical scavenging activity of certain Egyptian *Ficus* species leaf samples. *Food Chemistry*, v. 114, p. 1271-1277, 2009.
- Al-Fatimi, M.; Wurster, M.; Schröder, G.; Lindequist, U. Antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of selected medicinal plants from Yemen. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 111, p. 657–666, 2007.
- Ang-Lee, M. K.; Moss, J.; Yuan, C. S. Herbal medicines and perioperative care. *The Journal of the American Medical Association*, v. 286, p. 208–216, 2001.
- Baker, K. P.; Baron, W. F.; Henzel, W. J.; Spencer, S. A. Molecular cloning and characterization of human and murine DNase II. *Gene*, v. 215, p. 281-289, 1998.
- Barroso, G. M.; Peixoto, A. L.; Ichaso, C. L. F.; Guimarães, E. F.; Costa, C. G. *Sistemática de Angiospermas do Brasil*. Viçosa, Minas Gerais: UFV, v. 1, ed. 2, p. 96-103, 2010.
- Berg C. C. Classification and distribution of *Ficus*. *Experientia*, v. 45 p. 605-611, 1989b.
- Berg, C. C. The subdivision of *Ficus* subgenus *Pharmacosycea* section *Pharmacosycea* (Moraceae). *BLUMEA*, v. 51, p. 147–151, 2006.
- Berg, C. C.; Vilaviccencio, X. Taxonomic studies on *Ficus* (Moraceae) in the West Indies, extra-Amazonian Brazil, and Bolivia. *Ilicifolia*, v. 5, p. 1-177, 2004.

- Blois, M. S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, v. 26, p. 1199-1200, 1958.
- BRASIL. ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/hotsite/farmacopeia/ctt/conteudo/cont\\_comite\\_tecnico\\_apoiopolitica.htm](http://www.anvisa.gov.br/hotsite/farmacopeia/ctt/conteudo/cont_comite_tecnico_apoiopolitica.htm)>. Acesso em: 08/04/2010.
- BRASIL. Decreto Presidencial 5.813 de 22 de junho de 2006b.
- BRASIL. Portaria GM nº 971, de 02/05/2006a.
- Briskin, D. P. Medicinal plants and phytomedicines. *Plant Physiology*, v. 124, p. 507–514, 2000.
- Cai, Y.; Luo, Q.; Sun, M.; Corke, H. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sciences*, v. 74, p. 2157–2184, 2004.
- Carauta, J. P. P. *Ficus* (Moraceae) no Brasil: conservação e taxonomia. São Paulo: Albertoa, v. 2, 365p, 1989.
- Carauta, J. P. P.; Diaz, B. E. *Figueiras no Brasil*. Rio de Janeiro, Editora UFRJ, 212p, 2002.
- Chan, K. Some aspects of toxic contaminants in herbal medicines. *Chemosphere*, v. 52, p. 1361–1371, 2003.
- Chang, M. S.; Yang, Y. C.; Kuo, Y. C.; Kuo, Y. H.; Chang, C.; Chen, C. M.; Lee, T. H. Furocoumarin glycosides from the leaves of *Ficus ruficaulis* Merr. var. *antaoensis*. *Journal of Natural Products*, v. 68, p. 11–13 (Erratum 68, 634), 2005.
- Chang, M. S.; Yang, Y. C.; Kuo, Y. C.; Kuo, Y. H.; Chang, C.; Chen, C. M.; Lee, T. H. Furocoumarin glycosides from the leaves of *Ficus ruficaulis* Merr. var. *antaoensis*. *Journal of Natural Products*, v. 68, p. 11–13, 2005.
- Chiang, Y. M.; Chang, J. Y.; Kuo, C. C.; Chang, C. Y.; Kuo, Y. H. Cytotoxic triterpenes from the aerial roots of *Ficus microcarpa*. *Phytochemistry*, v. 66, p. 495–501, 2005.
- Choi, C. W.; Kim, S. C.; Hwang, S. S.; Choi, B. K.; Ahn, H. J.; Lee, M. Y.; Park, S. H.; Kim, S. K. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. *Plant Science*, v. 163, p. 1161-1168, 2002.
- Clement, W. L.; Weiblen, G. D. Morphological Evolution in the Mulberry Family (Moraceae). *Systematic Botany*, v. 34, n. 3, p. 530-552, 2009.

- Daniel, R. S.; Mathew, B. C.; Devi, K. S.; Augusti, K. T. Antioxidant effect of two flavonoids from the bark of *Ficus bengalensis* Linn in hyperlipidemic rats. *Indian Journal of Experimental Biology*, v. 36, p. 902–906, 1998.
- Dantas, Flávio J. S.; Moraes, Milton O.; Mattos, José C. P. de; Bezerra, Roberto J. A. C.; Carvalho, Elizeu F.; Bernardo Filho, Mário; Araújo, Adriano Caldeira de. Stannous chloride mediates single strand breaks in plasmid DNA through reactive oxygen species formation. *Toxicology Letters*, v. 110, p. 129–136, 1999.
- Darbour, N.; Bayet, C.; Rodin-Bercion, S.; Elkhomsi, Z.; Lurel, F.; Chaboud, A.; Guilet, D. Isoflavones from *Ficus nymphaefolio*. *Natural Products Research*, v. 21, p. 461–464, 2007.
- Datwyler, S. L.; Weiblen, G. D. On the origin of the Fig: phylogenetic relationships of Moraceae from NDHF sequences. *American Journal of Botany*, v. 91, n. 5, p. 767-777, 2004.
- De Flora, S.; Bronzetti, G.; Sobels, F. H. Assessment of antimutagenicity and anticarcinogenicity. *Mutation Research*, v. 267, p. 153–155, 1992.
- De Mattos, J. C. P.; Dantas, F. J. S.; Bezerra, R. J. A. C.; Bernardo-Filho, M.; Cabral-Neto, J. B.; Lage, C.; Leitão, A. C.; Caldeira-De-Araújo, A. Damage induced by chloride in plasmid DNA. *Toxicology Letters*, v. 116, p. 159-163, 2000.
- De Souza, P. P. Moraceae Gaudich de Viçosa, Minas Gerais, Brasil: florística e anatomia foliar de *Ficus mexiae* Standl. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 157f, 2009.
- Diaz, G.; Arruda, A. C.; Arruda, M. S. P.; Muller, A. H. Methoxyflavones from *Ficus maxima*. *Phytochemistry*, v. 45, n. 8, p. 1697–1699, 1997.
- Ferreira, I. C. D. F.; Vargas, V. M. F. Mutagenicity of medicinal plant extracts in Salmonella/microsome assay. *Phytotherapy Research*, v. 13, p. 397-400, 1999.
- Fitzpatrick, D. F.; Hirschfield, S. L.; Coffey, R. G. Endothelium dependent vasorelaxing activity of wine and other grape products. *American Journal of Physiology*, v. 265, p. H774–H778, 1993.
- Fuhrman, B.; Lavy, A.; Aviram, M. Consumption of red wine with meals reduces the susceptibility of human plasma and low-densitylipoprotein to lipid-peroxidation. *American Journal of Clinical Nutrition*, v. 61, p. 549–554, 1995.
- Fundação SOS Mata Atlântica, INPE. Atlas: evolução de remanescentes florestais e ecossistemas associados do domínio da Mata Atlântica no período 1985-1990. São Paulo: Fundação SOS Mata Atlântica, p. 199, 1993.

- Fundação SOS Mata Atlântica. Disponível em: <<http://www.sosmatatlantica.org.br/index.php?section=info&action=mata>>. Acesso em: 08/04/2010.
- Hahn, W. C.; Weinberg, R. A. Rules for making human tumor cells. *New England Journal of Medicine*, v. 347, p. 1593–603, 2002.
- Harborne, J. B. *Phytochemical methods: A guide to modern techniques of plant analysis*. London: Chapman and Hall, 278p., 1984.
- Hartman, P. E.; Shankel, D. M. Antimutagens and anticarcinogens: a survey of putative interceptor molecules. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, v. 15, p. 145–182, 1990. Errata em: *Environ Mol Mutagen*, v. 16, p. 136, 1990.
- Knapp, L. Fitoterapia abre novos campos de pesquisa. *Gazeta Mercantil*, n. 22170, 18 set., 2001.
- Kumaran, A.; Karunakaran, J. In vitro antioxidant activities of methanol extracts of five *Phyllanthus* species from India. *LWT – Food Science and Technology*, v. 40, p. 344–352, 2006.
- Labieniec, M.; Gabryelak, T. Effects of tannins on Chinese hamster cell line B14. *Mutation Research*, v. 539, p. 127–135, 2003.
- Labieniec, M.; Gabryelak, T.; Falcioni, G. Antioxidant and pro-oxidant effects of tannins in digestive cells of the freshwater mussel *Unio tumidu*. *Mutation Research*, v. 539, p. 19–28, 2003.
- Lanskya, E. P.; Paavilainena, H. M.; Pawlus, A. D.; Newman, R. A. *Ficus* spp. (fig): Ethnobotany and potential as anticancer and anti-inflammatory agents. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 119, p. 195–213, 2008.
- Levin, D. E.; Hollstein, M. C.; Christman, M. F.; Schwiers, E. A.; Ames, B. N. A new salmonella tester strain (TA102) with A:T base pairs at the site of mutation detects oxidative mutagens. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 79, p. 7445–7449, 1982b.
- Levin, D. E.; Yamasaki, E.; Ames, B. N. A new salmonella tester strain for the detection of frameshift mutagens: a run of cytosines as a mutational hot-spot. *Mutation Research*, v. 94, p. 315–330, 1982a.
- Li, C.; Bu, P. B.; Yue, D. K.; Sun, Y. F. Chemical constituents from roots of *Ficus hirta*. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*, v. 31, p. 131–133, 2006.
- Manian, R.; Anusuya, N.; Siddhuraju, P.; Manian, S. The antioxidant activity and free radical scavenging potential of two different solvent extracts of *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntz, *Ficus bengalensis* L. and *Ficus racemosa* L.. *Food Chemistry*, v. 107, p. 1000–1007, 2008.

- Marco, G. A rapid method for evaluation of antioxidants. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 45, p. 594-598, 1968.
- Maron, D. M.; Ames, B. N. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutation Research*, v. 113, p. 173-215, 1983.
- Mello Filho, L. E. Introdução ao Estudo do Gênero *Ficus* (Moraceae) da Guanabara e arredores. Tese, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da Universidade do Estado da Guanabara, Rio de Janeiro, 51f, 1963.
- Miller, H. E. A simplified method for the evaluation of antioxidant. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v.48, p.91, 1971.
- MOBOT – Missouri Botanical Garden. Disponível em: < <http://www.missouribotanicalgarden.org/> > Acesso em: 26/05/2011.
- 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* (Eriocaulaceae) e dos compostos flavonídicos 7-metoxilados relacionados. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 12, n. 1, p. 11-19, 2002.
- Mortelmans, K.; Zeiger, E. The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. *Mutation Research*, v. 455, n. 1-2, p. 29-60, 2000.
- Negri, M. L. S.; Possamai, J. C.; Nakashima, T. Atividade antioxidante das folhas de espinheira-santa - *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss., secas em diferentes temperaturas. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 19(2B), p. 553-556, 2009.
- NYBG – The New York Botanical Garden. Disponível em: < <http://www.nybg.org/> > Acesso em: 26/05/2011.
- Okuda, T. Systematics and health effects of chemically distinct tannins in medicinal plants. *Phytochemistry*, v. 66, p. 2012–2031, 2005.
- Osawa, C. C.; Felício, P. E. De; Gonçalves, L. A. G. Teste de tba aplicado a carnes e derivados: métodos tradicionais, modificados e alternativos. *Química Nova*, v. 28, n. 4, p.655-663, 2005.
- Paes-Leme, A. A.; Motta, E. S.; Mattos, J. C. P. De; Dantas, F. J. S.; Bezerra, R. J. A. C.; Araujo, A. C. de. Assessment of *Aloe vera* (L.) genotoxic potential on *Escherichia coli* and plasmid DNA. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 102, p. 197–201, 2005.
- Patwardhan, B.; Vaidya, A. B. D.; Chorghade, M. Ayurveda and natural products drug discovery. *Current Science*, v. 86, p. 789–799, 2004.
- Pederneiras, L. C.; Costa, A. F. Da; Araujo, D. S. D. de; Carauta, J. P. P. Moraceae das restingas do estado do Rio de Janeiro. *Rodriguésia – Revista do Jardim Botânico do Rio de Janeiro*, v. 62, n. 1, p. 77-92, 2011.

- Pessuto, M. B.; Costa, I. C. da; Souza, A. B. de; Nicoli, F. M.; Mello, J. C. P. de; Petereit, F.; Luftmann, H. Atividade antioxidante de extratos e taninos condensados das folhas de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss. *Química Nova*, v. 32, n. 2, 2009.
- Renaud, S.; Delorgeril, M. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart-disease. *The Lancet*, v. 339, p. 1523–1526, 1992.
- Rietjens, I. M. C. M.; Boersma, M. G.; Woude, H. van der; 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.
- Romaniuc Neto, S.; Carauta, J. P. P.; Vianna Filho, M. D. M.; Pereira, R. A. S.; Ribeiro, J. E. L. da S.; Machado, A. F. P.; Santos, A. dos; Pelissari, G. Moraceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2010.
- Rubnov, S.; Kashman, Y.; Rabinowitz, R.; Schlesinger, M.; Mechoulam, R. Suppressors of cancer cell proliferation from fig (*Ficus carica*) resin: isolation and structure elucidation. *Journal of Natural Products*, v. 64, p. 993–996, 2001.
- Sambroock, J.; Fritsch, E. F.; Maniatis, T. Extraction and purification of plasmid DNA. Molecular cloning: a laboratory manual. *Cold Spring Harbour Laboratory Press*, x<sup>rd</sup> edition, 1989.
- Sheu, Y. W.; Chiang, L. C.; Chen, I.S.; Chen, Y. C.; Tsai, I. L. Cytotoxic flavonoids and new chromenes from *Ficus formosana* f. *formosana*. *Planta Medica*, v. 71, p. 1165–1167, 2005.
- Shirwaikar, A.; Rajendran, K.; Punithaa, I. S. In vitro antioxidant studies on the benzyl tetra isoquinoline alkaloid berberine. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, v. 29, p. 1906–1910, 2006.
- Shukla, R.; Gupta, S.; Gambhir, J. K.; Prabhu, K. M.; Murthy, P. S. Antioxidant effect of aqueous extract of the bark of *Ficus bengalensis* in hypercholesterolaemic rabbits. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 92, p. 47–51, 2004.
- Silva, F. A. M.; Borges, M. F. M.; Ferreira, M. A. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. *Química Nova*, v. 22, n. 1, 1999.
- Singh, D.; Singh, B.; Goel, R. K. Traditional uses, phytochemistry and pharmacology of *Ficus religiosa*: a review. *Journal of Ethnopharmacology*, p. 6, 66p, 2011.
- Snyder, L.; Champness, W. Molecular Genetics of Bacteria. Washington DC: ASM Press, 3<sup>rd</sup> edition, 2007.

- Stankevicins, L.; Aiub, C.; De Santa Maria, L. C.; Lobo-Hajdu, G.; Felzenszwalb, I. Genotoxic and antigenotoxic evaluation of extracts from *Arenosclera brasiliensis*, a Brazilian marine sponge. *Toxicology in Vitro*, 2008.
- Ullman, S. B.; Halberstaedter, L.; Leibowitz, J. Some pharmacological and biological effects of the latex of *Ficus carica* L. *Experimental Medicine and Surgery*, v. 3, p. 11–23, 1945.
- Vinson, J. A.; Dabbagh, Y. A. Effect of green and black tea supplementation on lipids, lipid oxidation and fibrinogen in the hamster: mechanisms for the epidemiological benefits of tea drinking. *FEBS Letters*, v. 433, p. 44–46, 1998.
- Wagner, H.; Bladt, S. Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas. Berlin: *Springer Verlag*, 2<sup>nd</sup> edition, 384p., 1996.
- Wagner, H.; Bladt, S.; Zgainski, E. M. Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas. Berlin: *Springer Verlag*, 1<sup>st</sup> edition, 320p., 1984.
- Weiblen, G. D. Phylogenetic relationships of functionally dioecious *Ficus* (Moraceae) based on ribosomal DNA sequences and morphology. *American Journal of Botany*, v. 87, n. 9, p. 1342-1357, 2000.
- White, B. L.; Howard, L. R.; Prior, R. L. Polyphenolic Composition and Antioxidant Capacity of Extruded Cranberry Pomace. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 58, p. 4037–4042, 2010.
- WHO – World Health Organization. The World Medicine Situation. Traditional medicines: global situation, ISSUES and challenges. *WHO Press*, Geneva, 3<sup>rd</sup> edition, 2011.
- Wu, P.-L.; Rao, K.V.; Su, C.-H.; Kuoh, C.-S.; Wu, T.-S. Phenanthroindolizidine alkaloids and their cytotoxicity from the leaves of *Ficus septica*. *Heterocycles*, v. 57, p. 2401–2408, 2002.
- Yagi, A.; Kabash, A.; Okamura, N.; Haraguchi, H.; Moustafa, S. M.; Khalifa, T. I. Antioxidant, free radical scavenging and anti-inflammatory effects of aloesin derivatives in *Aloe vera*. *Planta Medica*, v. 68, p. 957–960, 2002.
- Yang, C. W.; Chen, W. L.; Wu, P. L.; Tseng, H. Y.; Lee, S. J. Anti-inflammatory mechanisms of phenanthroindolizidine alkaloids. *Molecular Pharmacology*, v. 69, p. 749–758, 2006.
- Yu, L.; Haley, S.; Perret, J.; Harris, M.; Wilson, J.; Qian, M. Free radical scavenging properties of wheat extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 50, p. 1619–1624, 2002.
- Zaha, A.; Ferreira, H. B.; Passaglia, L. M. P. (Organizadores). *Biologia molecular básica*. Porto Alegre: Mercado Aberto, 3<sup>a</sup> edição, 424p., 2003.