

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA**

FERNANDO ALVES DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DA MUTAGENICIDADE,
GENOTOXICIDADE E CITOTOXICIDADE DE
EXTRATOS VEGETAIS DE *Myracrodruon urundeuva*
Allemão (ANACARDIACEAE)**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA
AMBIENTAL**

**DOURADOS/MS
MAIO/2015**

FERNANDO ALVES DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DA MUTAGENICIDADE,
GENOTOXICIDADE E CITOTOXICIDADE DE
EXTRATOS VEGETAIS DE *Myracrodruon urundeuva*
Allemão (ANACARDIACEAE)**

ORIENTADORA: PROF.^a DR.^a KELLY MARI PIRES DE
OLIVEIRA

Dissertação de mestrado submetida ao programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, como um dos requisitos necessários para a obtenção do título de mestre em Ciência e Tecnologia na área de concentração Ciência Ambiental.

**DOURADOS/MS
2015**

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central - UFGD

O48a	<p>Oliveira, Fernando Alves de.</p> <p>Avaliação da mutagenicidade, genotoxicidade e citotoxicidade de extratos vegetais de <i>Myracrodruon urundeuva</i> Allemão (Anacardiaceae). / Fernando Alves de Oliveira. – Dourados, MS : UFGD, 2015.</p> <p>74p.</p> <p>Orientadora: Prof.^a Dr.^a Kelly Mari Pires de Oliveira Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental) – Universidade Federal da Grande Dourados.</p> <p>1. <i>Myracrodruon urundeuva</i> Allemão – Árvore - Extrato – Análise. 2. Árvores - Fisiologia. I. Título.</p> <p>CDD – 582.1</p>
------	---



Termo de Aprovação

Após apresentação, arguição e apreciação pela banca examinadora, foi emitido o parecer APROVADO, para a dissertação intitulada: “**Avaliação da mutagenicidade, genotoxicidade e citotoxicidade de extratos vegetais de *Myracrodruon urundeuva* Allemão (Anacardiaceae)**”, de autoria de **Fernando Alves de Oliveira**, apresentada ao Programa de Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Federal da Grande Dourados.

Prof.^a Dr.^a Kelly Mari Pires de Oliveira
Presidente da banca examinadora

Prof. Dr. Luiz Eduardo Aparecido Grassi
Membro Examinador (UEMS)

Prof.^a Dr.^a Alexpia Barufatti Grisólia
Membro Examinador (UFGD)

Dourados/MS, 29 de Maio de 2015.

*Não existe Graal mais fugidio ou precioso na vida da mente que
a chave da compreensão humana.*
Edward O. Wilson

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, Maria Rosa Alves de Oliveira e José Jair Gonçalves de Oliveira, batalhadores que souberam criar e educar seus filhos independentemente das adversidades presentes no dia-a-dia. Incentivadores dos meus estudos. Principalmente minha mãe, que por muitas vezes foi o pilar de sustentação de nossa família, sempre apoiou minhas decisões e me ajudou nas horas que precisei.

Aos meus irmãos, Rosineize, Claudinei, Sidnei, Alexandro e Adriana, família grande e sempre que possível unida. Todos responsáveis por ajudar meus pais em minha formação, sendo também meus referenciais.

À minha namorada Denise, por ter sido a melhor companhia durante este período, pela amizade, paciência, e por sempre me ensinar a ter paciência para as coisas irem se ajeitando. Com certeza você foi um dos meus pilares de sustentação durante o mestrado.

À minha orientadora Prof.^a Dr.^a Kelly Mari Pires de Oliveira, por ter me dado um voto de confiança e me aceitado como seu orientando. Por todo ensinamento e experiências dadas, pela disponibilidade para conversar sobre o trabalho, pela paciência e dedicação.

Aos colegas do laboratório de Microbiologia Aplicada, Thaianne, Bruna, Allan, Wellington e Vagner, pela ajuda, companhia, paciência e aprendizado durante estes dois anos. Em especial a Adriana, Fabiana e Stephanie, que estiveram presentes durante o desenvolvimento do trabalho, sempre com muita dedicação e paciência, muito obrigado pela ajuda, sem vocês este trabalho não poderia ser feito.

À Vanessa Rorato que iniciou os trabalhos com *Myracrodruon urundeuva* no nosso laboratório, e pelos dados disponibilizados.

Ao Prof. Dr. Jonas da Silva Mota, por toda disponibilidade sempre oferecida, e por todo conteúdo que acrescentou a este trabalho.

À Prof. Zefa Valdivina Pereira e a MSc. Shaline Sefara, que auxiliaram na identificação e coleta das amostras vegetais.

Aos membros do laboratório de Mutagênese da UNESP de Araraquara, Prof.^a Dr.^a Eliana Varanda, Flávia, Lívia, Mariana e Rone pelo empenho durante o período de estágio que eu estive com vocês, pela paciência e aprendizado. Em especial a Prof.^a Eliana, que além da disponibilidade, doou as cepas de *Salmonella* Typhimurium utilizadas neste trabalho.

Aos membros do laboratório de Biologia Molecular Aplicada, Prof.^a Dr.^a Alexeia Baruffatti Grisolia, Priscila Leocádia e ao Bruno Crispim, por toda disponibilidade sempre oferecida durante o treinamento realizado neste laboratório. A Prof.^a Alexeia por ter me auxiliado no início do mestrado.

À Prof. MSc. Maria de Fátima Oliveira Mattos Grassi (Fatinha) e Prof. Dr. Luiz Grassi por todas as conversas, amizade e apoio.

Aos meus amigos Tobias, Anderson (Andertec) e Eder, pessoas importantes durante minha formação, referenciais acadêmicos e de dedicação.

Aos meus colegas do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, em especial a Nayara Maran, companheira também de laboratório, pelas conversas durante os anos de pós-graduação.

À UFGD, e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, pela oportunidade concedida e pelo apoio ao trabalho.

À Fundect pelo apoio ao trabalho, e a Capes pela bolsa de pós-graduação concedida.

LISTA DE ABREVIATURAS

Ae – Absorbância na presença do extrato
An – Absorbância do controle negativo
ANOVA – Análise de Variância
ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
Ap – Absorbância do controle positivo
ATCC – American Type Culture Collection
CBM – Concentração Bactericida Mínima
CFM – Concentração Fungicida Mínima
CIM – Concentração Inibitória Mínima
CL₅₀ – Concentração Letal 50%
CLAE – Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência
CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute
CN – Controle Negativo
CP – Controle Positivo
DAD – Detector de Arranjo de Diodos
DMSO – Dimetilsulfóxido
DNA – Deoxyribonucleic Acid
EAEC – Extrato Acetato de Etila da Casca
EAEF – Extrato Acetato de Etila da Folha
EEC – Extrato Etanólico da Casca
EEF – Extrato Etanólico da Folha
EHC – Extrato Hidroalcoólico da Casca
EHF – Extrato Hidroalcoólico da Folha
FDA – Food and Drug Administration
HCl – Ácido clorídrico
HPLC – High Performance/Pressure Liquide Chromatography
IAC – Índice de Alterações Cromossômicas
IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais e Renováveis
IG – Índice de Germinação
IM – Índice Mitótico
IMt – Índice de Mutagenicidade
IPCS - International Programme on Chemical Safety
ISO – International Organization for Standardization
LC₅₀ – Concentração letal 50%
Med/DP – Média e Desvio Padrão
NCA – Número de Células Alteradas
NCM – Número de Células em Mitose
NCMn – Número de Células que apresentaram Micronúcleos
NG – Número de sementes que germinaram
NQC – Número de células que apresentaram Quebra Cromossômica
OECD – Organization for Economic Co-operation and Development
OMS – Organização Mundial da Saúde
PBS – Phosphate Buffered Saline
pH - potencial Hidrogeniônico
RM – Razão de Mutagenicidade
SUS – Sistema Único de Saúde
TC – Total de Células observadas

TM – Tamanho Médio
TS – Total de Sementes
UFC – Unidade de Formação de Colônias
UFGD – Universidade Federal da Grande Dourados
UV – Ultravioleta
WHO – World Health Organization

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Concentração Inibitória Mínima (CIM), Concentração Fungicida Mínima (CFM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) dos extratos etanólico e frações da folha e casca de <i>M. urundeuva</i> frente a cepas da <i>American Type Culture Collection</i> (ATCC).	39
Tabela 2. Concentração de metabólitos secundários no extrato etanólico da folha e casca de <i>M. urundeuva</i> pela técnica de HPLC.	41
Tabela 3. Índice de germinação (IG) das sementes, Tamanho médio das raízes (TM), Índice Mitótico (IM), Índice de alterações cromossômicas (IAC) e Índice de Mutagenicidade (IMt) em <i>A. cepa</i> , após tratamento com diferentes concentrações dos extratos etanólico da folha e casca de <i>M. urundeuva</i>	42
Tabela 4. Atividade mutagênica avaliada pelo número de colônias e a razão de mutagenicidade induzida pelo extrato etanólico da folha e casca de <i>M. urundeuva</i> , nas cepas TA97a, TA98, TA100 e TA102 de <i>S. Typhimurium</i>	44
Tabela 5. Atividade hemolítica dos extratos etanólicos das folhas e casca de <i>M. urundeuva</i>	45

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Visão geral dos mecanismos pelos quais mutágenos de atuação direta e indireta e outras moléculas podem desempenhar na carcinogênese. (Adaptado de Kirsch-Volders et al., 2003).....	14
Figura 2. Coleta do material vegetal, folhas (esquerda) e casca (direita) de <i>Myracrodruon urundeuva</i> . Fonte: Oliveira, 2013.	54
Figura 3. Extração líquido-líquido. Fonte: Oliveira, 2014.	54
Figura 4. Microplaca com diferentes concentrações do extrato hidroalcoólico da casca de <i>M. urundeuva</i> para avaliação da CIM em bactérias. Fonte: Oliveira, 2014.	55
Figura 5. Placas com sementes de <i>Allium cepa</i> em diferentes concentrações do extrato etanólico da folha de <i>M. urundeuva</i> (a= 0,2; b= 0,3; c= 0,4; d= 0,5 e; e= 1mg mL ⁻¹). Fonte: Oliveira, 2014.	55
Figura 6. Células meristemáticas de <i>Allium cepa</i> , indicando os diferentes estágios de divisão celular (A – da esquerda para direita metáfase, prófase e telófase), célula com micronúcleo (B) e telófase com ponte cromossômica (C). Fonte: Oliveira, 2014.	56
Figura 7. Placas em cultivo para o teste de Ames do extrato etanólico da casca de <i>M. urundeuva</i> . Fonte: Oliveira, 2015.	56

RESUMO

Muitos fármacos utilizados atualmente são derivados de plantas que foram empregados primeiramente como medicinais pela população indígena, neste sentido, o conhecimento tradicional tem se mostrado uma ferramenta útil na busca de novos medicamentos. Porém, a maioria das plantas utilizadas como medicinais não foram avaliadas quanto sua eficácia e segurança. O objetivo do trabalho foi verificar a atividade antimicrobiana do extrato da casca e folhas de *M. urundeuva* e avaliar sua toxicidade, citotoxicidade, mutagenicidade e genotoxicidade. Os extratos foram avaliados quanto a Concentração Inibitória Mínima em leveduras e bactérias ATCC e testados utilizando-se o teste de Ames sem ativação metabólica, teste em *Allium cepa*, avaliação da atividade hemolítica e teste de toxicidade aguda em ratos. Os extratos etanólico da casca e folhas apresentaram atividade antimicrobiana, reduziram a germinação das sementes, o tamanho das raízes e diminuíram a atividade mitótica em *A. cepa*, além de apresentar toxicidade aguda em ratos. Não foi observada atividade hemolítica em eritrócitos. Os extratos não induziram alterações nucleares nas células meristemáticas de *A. cepa*, bem como não apresentaram atividade mutagênica no teste de Ames. Os testes em *A. cepa* e de Ames apresentaram associação entre os resultados. Foi observada associação nos resultados entre o teste em *A. cepa* e de toxicidade aguda em ratos. Com base nos resultados, os extratos da casca e folhas de *M. urundeuva* devem ser evitados, principalmente sua ingestão, devido à toxicidade e citotoxicidade observada.

ABSTRACT

Many drugs currently used are derived from plants that have been used primarily as medicinal by the indigenous population, in this sense, traditional knowledge has proven a useful tool in the search for new drugs. However, most plants used in traditional medicine have not been evaluated for efficacy and safety. The objectives were to assess the antimicrobial activity of the extract of the bark and leave of *M. urundeuva* and evaluate its toxicity, cytotoxicity, mutagenicity and genotoxicity. Extracts were evaluated for Minimum Inhibitory Concentration in yeast and bacteria ATCC and tested using the Ames test without metabolic activation, *Allium cepa* test, evaluation of hemolytic activity and acute toxicity test in rats. The ethanol extracts of bark and leaves showed antimicrobial activity, reduced seed germination, the size of the roots and decreased mitotic activity in *A. cepa* strain, as well as presenting acute toxicity in rats. There was no hemolytic activity in erythrocytes. The nuclear extracts did not induce changes in the meristemetic cells of *A. cepa* and showed no mutagenic activity in the Ames test. The tests *A. cepa* and Ames were associated in the results. An association was observed between the test results in *A. cepa* and acute toxicity in mice. Based on the results, the extracts from the bark and leaves of *M. urundeuva* should be avoided, especially your intake due to toxicity and cytotoxicity observed.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	10
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
2.1. Plantas Medicinais e Fitoterápicos	11
2.2. <i>Myracrodruon urundeuva</i>	12
2.3. Agentes mutagênicos e danos ao DNA	13
2.4. Citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade	15
2.5. Testes de avaliação mutagênica, genotóxica, citotóxica e tóxica	16
2.5.1. Teste em <i>Allium cepa</i>	16
2.5.2. Teste de mutagenicidade com <i>Salmonella Typhimurium</i> (Teste de Ames)..	18
2.5.3. Avaliação da atividade hemolítica	20
2.5.4. Toxicidade aguda	21
3. OBJETIVOS	22
3.1. Objetivos Geral	22
3.2. Objetivos Específicos	22
REFERÊNCIAS	23
4. ARTIGO	30
<i>Myracrodruon urundeuva</i> : atividade antimicrobiana e avaliação toxicológica pelos testes de Ames, <i>Allium cepa</i> , atividade hemolítica e toxicidade aguda.	30
5. CONCLUSÃO GERAL	53
ANEXOS	54

Esta dissertação segue as normas da Revista Journal of Ethnopharmacology.
ISSN: 0378-8741

1. INTRODUÇÃO GERAL

A utilização de plantas no tratamento e na cura de enfermidades é relatada ao longo da história humana, e ainda hoje o é, sendo em diversas comunidades o único recurso terapêutico (Carneiro et al., 2014). Mesmo sendo valorizados historicamente, os fitoterápicos foram substituídos ao longo do tempo por compostos sintéticos mais eficazes. Porém, a fácil aceitabilidade, disponibilidade e baixo custo dos fitoterápicos têm favorecido a utilização de plantas medicinais e, estimulado os estudos voltados a esta área.

No Brasil, cerca de 80% da população utiliza produtos à base de plantas medicinais para o tratamento e prevenção de doenças, tendo como base o conhecimento tradicional, uso popular, transmissão oral entre gerações ou através de sistemas oficiais de saúde (Brasil, 2012).

O grande consumo de produtos fitoterápicos no Brasil pode estar relacionado à existência de uma flora diversificada no país, além de uma extraordinária diversidade cultural, que apresenta diferentes formas de utilização terapêutica desses recursos (Brasil, 2012). Essas características têm favorecido o desenvolvimento de várias pesquisas para comprovação da atividade biológica, caracterização fitoquímica e obtenção de novos princípios ativos a partir de plantas existentes nos diferentes ecossistemas brasileiros (Ribeiro et al., 2014).

Diversos laboratórios e indústrias farmacêuticas buscam novos agentes antimicrobianos com estruturas ativas ou com atividades complementares às drogas já existentes, através dos estudos das plantas, na tentativa de se encontrar a cura para doenças causadas por micro-organismos multirresistentes e de novas doenças (Varanda, 2006).

Porém, para a liberação do uso de uma planta ou de seus componentes, exige-se completa investigação da eficácia e segurança dos compostos presentes em uma dada espécie, sendo que ao final deve-se observar que os benefícios do uso da nova molécula podem superar seus efeitos colaterais. A Resolução nº 90, de 16 de março de 2004, da ANVISA, que indica os métodos padronizados para os estudos de toxicologia pré-clínica para registro e renovação de registro de fitoterápicos, exige a realização de estudos avaliando a toxicidade e genotoxicidade de plantas medicinais (Brasil, 2004).

Os estudos para identificar a ação dos compostos nos organismos e em diferentes componentes celulares, têm desenvolvido diversos ensaios de avaliação da toxicidade dos compostos (Fiskesjö, 1994; Maron e Ames, 1983; Khalil e Ei-Adawy, 1994; OECD, 2001). As finalidades dos testes irão determinar quais tipos de organismos serão utilizados. Os bioensaios com procariotas permitem a detecção de agentes que induzem mutações nos genes e danos primários ao DNA. As análises com organismos eucariontes permitem a detecção de maior extensão de danos, como mutações genéticas, danos cromossômicos e aneuploidias, além da identificação de compostos citotóxicos e tóxicos (Leme e Marin-Morales, 2009).

Neste sentido, estudos que visem apresentar a avaliação do potencial tóxico, citotóxico, genotóxico e mutagênico de plantas utilizadas popularmente, tornam-se importantes para a busca da prevenção a saúde humana.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Plantas Medicinais e Fitoterápicos

O conhecimento sobre plantas medicinais faz parte do contexto social humano desde as civilizações mais antigas até os dias atuais, e está intrinsecamente relacionado à história da medicina. No início, o homem descobria como curar suas doenças e feridas através da observação, tentativas, erros e acertos, a partir deste conhecimento inicial que foi passado de geração em geração, foi constituída a base da medicina moderna (Mendanha et al., 2010).

Ainda hoje, a busca por novos medicamentos à base de plantas, é fundamentada no conhecimento popular. Muitos fármacos utilizados atualmente são derivados de plantas que foram empregados pela primeira vez na medicina tradicional, ou seja, utilizadas primeiramente com base em conhecimentos tradicionais das populações. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) aproximadamente 25% dos medicamentos são de origem vegetal (Saslis-Lagoudakis et al., 2012).

Para a OMS, plantas medicinais são aquelas que têm uma história de uso tradicional como agente terapêutico. Segundo a ANVISA, planta medicinal é toda planta ou partes dela que contenham as substâncias ou classes de substâncias responsáveis pela ação terapêutica (Brasil, 2010). Os medicamentos fitoterápicos, de

acordo com a ANVISA, são medicamentos obtidos exclusivamente de matérias-primas vegetais (Brasil, 2011).

As plantas medicinais são consideradas uma forma alternativa de tratamento em várias partes do mundo, pois, acredita-se na ideia de que medicamentos a base de plantas e produtos naturais são mais seguros do que os medicamentos sintéticos (Silva et al. 2008; Turolla e Nascimento, 2006). Além disso, em muitos casos, a medicina popular é o único acesso que as populações têm para tratar suas doenças, devido às condições socioeconômicas que dificultam o acesso a medicamentos alopáticos (Rates, 2001).

Calcula-se que em torno de 10.000 a 53.000 espécies de plantas são usadas tradicionalmente em todo o mundo (Schippmann et al., 2002; McChesney et al., 2007), no entanto, apenas uma pequena proporção destas foram avaliadas quanto suas atividades biológicas (Saslis-Lagoudakis et al., 2012). No Brasil, um levantamento realizado apenas no Cerrado, listou 298 espécies de plantas utilizadas pela população para fins medicinais (Carneiro e Santos, 2014).

Em 2008, foi aprovada no Brasil a Portaria Interministerial nº 2960, que criou o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e o comitê Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. O objetivo do programa foi propor medidas de segurança para o uso de fitoterápicos por parte da população, bem como o acesso e o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos. O programa busca ainda aumentar o número de fitoterápicos oferecidos pelo Sistema Único de Saúde (SUS) (Brasil, 2009).

Portanto, a aquisição de conhecimento sobre as plantas medicinais utilizadas tradicionalmente é importante para obtenção de novas drogas para o tratamento de doenças e, como medida de segurança para a população que faz uso contínuo de fitoterápicos, uma vez que a planta utilizada pode possuir agentes tóxicos.

2.2. *Myracrodruon urundeuva*

A família Anacardiaceae é representada por plantas de porte arbustivo a arbóreo, tendo sua ocorrência em regiões tropicais e subtropicais (Barroso, 1991). Nesta família estão presentes muitas espécies cujas folhas e o caule são utilizados na medicina tradicional, dentre estas destacam-se: *Myracrodruon urundeuva* Allemão, *Schinus*

terebinthifolius Raddi, *S. lentiscifolius* Marchand, *S. molle* L. e *Lithraea brasiliensis* Marchand (Kato e Akisue, 2002).

A espécie *Myracrodruon urundeuva* é conhecida popularmente como aroeira, aroeira-do-sertão, arendeúva, arindeúva, aroeira-da-serra, aroeira-preta e urundeúva (Lorenzi e Matos, 2008). Seu limite de distribuição natural se estende pelas Regiões Nordeste, Sudeste e Centro-Oeste do Brasil até a Bolívia, Paraguai e Argentina (Santin e Leitão-Filho, 1991; Lorenzi, 1992).

A aroeira possui tamanho variado conforme a região de sua ocorrência, podendo atingir 30 metros de altura (Rizzini, 1971). Seu florescimento ocorre entre julho e setembro, e a maturação dos frutos ocorre de setembro a outubro (Lorenzi, 1992; Andrade et al., 2000).

Segundo o IBAMA (2008), *M. urundeuva* é uma das espécies ameaçadas de extinção, sendo, portanto, categorizada como uma espécie vulnerável. A presença nesta lista se deve principalmente ao uso de sua madeira como matéria-prima em obras externas como postes, mourões, esteios, dormentes, armações de pontes, na construção civil, como caibros, vigas, para peças torneadas, etc. (Salis e Crispim, 2006).

Na fitoterapia, *M. urundeuva* é utilizada por populações indígenas e não indígenas do Brasil, sob a forma de semicúprio (“banho-de-assento”) após o parto (Cunha et al., 2009), e também como adstringente, anti-inflamatório, cicatrizante e no tratamento da gastrite e úlcera (Oliveira Júnior e Conceição, 2010). Pesquisas apontam que esta planta possui atividade antimicrobiana, porém estudos indicam que ela pode ser tóxica (Almeida et al., 2010; Jandú et al., 2013; Ustulin et al., 2009).

Através da análise fitoquímica do caule e folhas *M. urundeuva* foram observadas a presença de esteroides, fenóis simples, flavanonas, flavanonóis, saponinas, taninos e xantonas (Pinho et al., 2012; Figueredo et al., 2014). Destaca-se nesta lista a presença de flavonoides (flavononas, flavanonóis), saponinas e taninos, pois estes compostos são relatados por possuírem propriedades antimicrobianas e antioxidantes (Akiyama et al., 2001; Cushnie e Lamb, 2005).

2.3. Agentes mutagênicos e danos ao DNA

Os fatores genéticos e ambientais se complementam no surgimento do câncer, ou seja, além da propensão (susceptibilidade genética) ao câncer, causas externas

(ambientais) têm favorecido o surgimento de mutações genéticas que favorecem o surgimento desta doença (Nickels et al., 2013).

Diariamente sofremos danos no DNA decorrentes da exposição a diversos compostos químicos e outros fatores ambientais. As principais alterações presentes na fita de DNA são o aparecimento de mutações, que podem causar alterações metabólicas nas células, bem como resultar na sua morte (Nickels et al., 2013; Tomasetti e Vogelstein, 2015).

Quando uma mutação apresenta como resultante uma alteração no metabolismo celular, esta pode ser neutra ou não, podendo causar uma desordem no metabolismo celular, e induzir um crescimento anormal das células, dando origem a neoplasias (Ribeiro et al., 2003). Segundo Tomasetti e Vogelstein (2015), dois terços dos cânceres ocasionados em adultos são decorrentes de mutações durante o processo de divisão celular, sendo grande a probabilidade de esses genes defeituosos serem passados para outras gerações.

A exposição a um mutágeno pode resultar em diferentes tipos de danos ao DNA (aductos de DNA, sítios álcali-lábeis e quebras de fitas), sendo que, as mutações podem envolver alterações em um único nucleotídeo (mutação gênica ou puntiforme), e aberrações cromossômicas atingindo cromossomos inteiros ou pedaços de cromossomos (Mateuca et al., 2006). Os mutágenos podem ter ação direta e indireta na fita de DNA, a Figura 1 mostra os mecanismos pelos quais as moléculas podem induzir alterações nas células e a carcinogênese (Kirsch-Volders et al., 2003).

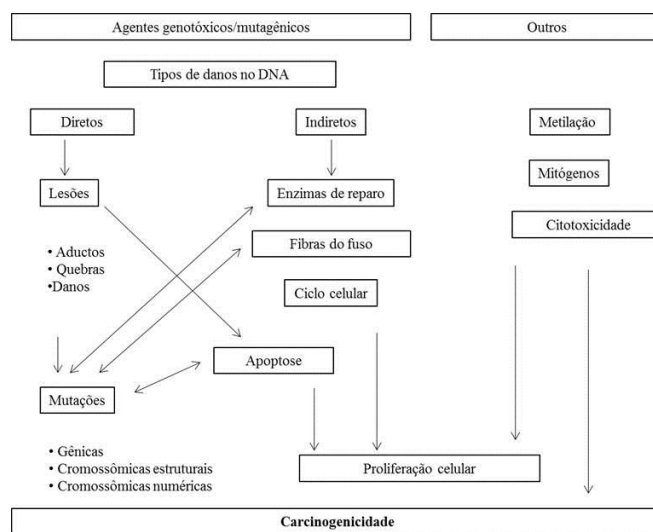


Figura 1. Visão geral dos mecanismos pelos quais mutágenos de atuação direta e indireta e outras moléculas podem desempenhar na carcinogênese. (Adaptado de Kirsch-Volders et al., 2003).

Em decorrência das diversas vias que os compostos podem atuar, diversos ensaios de genotoxicidade foram desenvolvidos (Maron e Ames, 1983; Fiskeşjö, 1994; Khalil e Ei-Adawy, 1994). Cada teste se propõe a avaliar uma via de dano que os compostos podem ter, os objetivos de cada estudo irão determinar quais tipos de organismos serão utilizados durante os testes.

2.4. Citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade

Considerando as diversas vias de ação que os compostos podem ter nos organismos, o uso de vários testes para avaliação de um composto torna-se necessária, pois, aumenta a segurança e garante a eficiência do composto avaliado.

Estudos que visam avaliar a citotoxicidade de um composto têm por objetivo avaliar os danos causados às células decorrentes da exposição a um agente citotóxico, ou seja, um agente que causa dano na célula capaz de induzir a morte celular (Riss e Moravec, 2004).

A avaliação da viabilidade celular é o parâmetro mais utilizado para avaliar a citotoxicidade. Neste método são utilizados corantes específicos para corar diferencialmente células que sofreram dano e/ou estão em processo de apoptose (Rogerio et al., 2003). Além deste parâmetro, a citotoxicidade pode ser evidenciada pela alteração no crescimento de um tecido, bem como pela diminuição no número de células em processo de divisão celular (mitose ou meiose) (Leme e Marin-Morales, 2009).

Em geral a avaliação do potencial citotóxico envolve ensaios em culturas celulares (humanas e de outros organismos). As principais culturas de células utilizadas são as linfocitárias humanas e células provenientes de hamster Chinês, como por exemplo, células CHO (*Chinese Hamster Ovary*), células V79 (pulmonares), CHL/IU (*Chinese Hamster Lung*), dentre outras (Takahashi et al., 2003). Outro teste *in vitro* para avaliação da citotoxicidade de uma substância é o teste para avaliação da atividade hemolítica, utilizando sangue humano (Jandú et al., 2013) ou de outros animais (Hassan et al., 2010).

A citotoxicidade pode ser avaliada também por meio de ensaios com vegetais, dentre os quais, destaca-se o teste em *Allium cepa*. Neste ensaio é possível verificar a ação citotóxica dos compostos através do número de células em divisão e apoptose. O

teste em *A. cepa* permite avaliar outros parâmetros além da citotoxicidade dos compostos como, a atividade mutagênica e a toxicidade.

Além da citotoxicidade, para fins de regulamentação, os compostos também são analisados quanto a sua capacidade de serem mutagênicos ou genotóxicos. Os termos, mutagênico e genotóxico são frequentemente empregados de forma a causar confusão quanto ao seu uso.

Os agentes que danificam o DNA, causando lesões permanentes são considerados genotóxicos. Assim, a genotoxicidade é a capacidade que algumas substâncias têm de induzir alterações celulares que podem influenciar no funcionamento da maquinaria genética dos organismos expostos, podendo não agir diretamente na fita de DNA, mas causar danos em estruturas relacionadas ao núcleo como as fibras do fuso, enzimas e proteínas envolvidas na manutenção da integridade do genoma (Kirsch-Volders et al., 2003; Mateuca et al., 2006). Para avaliação genotóxica são utilizados testes que avaliam danos ao material nuclear, como quebras cromossômicas e micronúcleos. Exemplos de testes utilizados: teste em *Allium cepa* (Fiskesjö, 1994) e teste do Micronúcleo em animais (Schimid, 1975).

A mutagenicidade é a capacidade que uma substância tem de acelerar ou aumentar o surgimento de mutações, ou seja, são compostos que alteram as sequências de bases nitrogenadas em taxas superiores ao que normalmente pode ser registrado (Ribeiro et al., 2003). Exemplos de testes utilizados para avaliação da mutagenicidade: teste de mutagênese com *Salmonella Typhimurium* – Teste de Ames – (Maron e Ames, 1983) e Ensaio Cometa (Östling e Johanson, 1984).

2.5. Testes de avaliação mutagênica, genotóxica, citotóxica e tóxica

2.5.1. Teste em *Allium cepa*

O teste em *Allium cepa* foi desenvolvido por Levan (1938, 1949), para o estudo dos efeitos de produtos químicos em cromossomos de células das raízes dos bulbos de cebolas, sendo um bioensaio simples, rápido e com alta sensibilidade, o teste se baseia na avaliação de diversos parâmetros genotóxicos e citotóxicos (Grant, 1999).

A partir de sua criação o teste em *A. cepa* tornou-se importante ferramenta em pesquisas básicas para avaliação do potencial genotóxico e citotóxico de produtos

químicos, substâncias complexas como extratos de plantas, dejetos industriais e águas contaminadas (Cuchiara et al., 2012). Devido ao seu baixo custo, rapidez, facilidade de manipulação e a possibilidade de utilizar amostras sem tratamento prévio, o teste passou a estar presente em diversos laboratórios que trabalham com testes de genética toxicológica (Fiskesjö, 1994; Leme e Marin-Morales, 2009).

A utilização do método de avaliação das alterações cromossômicas em raízes de *A. cepa* é reconhecida pelo Programa Internacional de Segurança Química (IPCS, OMS) e o Programa Ambiental das Nações Unidas como um teste eficiente para análise e monitoramento *in situ* da genotoxicidade de substâncias ambientais (Cabrera e Rodriguez, 1999).

Trabalhos têm demonstrado a aplicação do teste de *A. cepa* para avaliação do potencial genotóxico de águas residuais (El-Shahaby et al., 2003; Cuchiara et al., 2012), solos contaminados (Cabrera e Rodriguez, 1999), infusões vegetais (Bagatini et al., 2007, Dias et al., 2014), metais pesados (Palacio et al., 2005) e de vegetais tratados com agrotóxicos (Feretti et al., 2007).

O teste de *A. cepa* permite utilizar dois parâmetros de avaliação toxicológica, macroscópicos, que avalia a presença de tumores, crescimento e forma das raízes, e microscópicos, que avalia alterações nos núcleos das células (cromossomos em anel, pontes cromossômicas, *sticky chromosomes*, retardos cromossômicos e formação de micronúcleos) e o índice mitótico, número de células em processo de divisão (Fiskesjö, 1994; Monarca et al., 2002). Além disso, este teste também permite avaliar a toxicidade do composto através da germinação das sementes.

O teste permite a avaliação de diferentes mecanismos genéticos afetados pela exposição a um agente mutagênico. As categorias genéticas que podem ser analisadas por este teste são:

- o índice mitótico, permite avaliar a influência dos compostos sobre a divisão celular, neste parâmetro é avaliado o número total de células em divisão no ciclo celular, esta análise tem sido utilizada como um parâmetro para avaliar a citotoxicidade de vários agentes, assim, os níveis de citotoxicidade de um agente podem ser determinados pela diminuição no índice mitótico (Fernandes et al., 2007).

- aberrações cromossômicas, permitem avaliar a influência dos compostos na indução de alterações na estrutura cromossômica ou no número total de cromossomos (Leme e Marin-Morales, 2009).

- anormalidades nucleares, são alterações morfológicas no núcleo interfásico, como resultado da ação do composto testado, podendo ser observados núcleos lobulados, gomos nucleares, células polinucleares, entre outros (Leme e Marin-Morales, 2009).

- micronúcleos, surgem a partir do desenvolvimento de algumas aberrações cromossômicas, por exemplo, quebras e perdas cromossômicas, podendo também ser derivada de outros processos como poliploidização, são identificados como sendo “núcleos” bem menores que o núcleo verdadeiro da célula (Fernandes et al., 2007).

Segundo Rank (2003), uma das vantagens do teste em *A. cepa* é a possibilidade de se avaliar a exposição direta do organismo a substância teste. Considera-se como outra vantagem do teste em *A. cepa* a presença de um sistema de metabolização dos compostos através de oxidação enzimática, sendo importante para avaliar subprodutos do composto original que podem apresentar uma atividade mutagênica, gerados a partir da exposição a estas enzimas (Fatima e Ahmad, 2006). Este fato é importante, pois outros testes, como o teste de Ames, é complementado com a utilização da fração S9 (fração obtida de fígado de rato – que representa um sistema metabólico exógeno) para se obter um sistema de metabolização de oxidação enzimática.

Porém, quando o sistema de enzima oxidase de plantas é comparado com as enzimas do citocromo P-450 de mamíferos, o complexo enzimático de plantas apresenta baixa concentração e uma limitação na especificação substrato (Rank e Nielsen, 1997). Apesar desta baixa especificidade, os resultados de bioensaios utilizando o teste em *A. cepa* não devem ser desconsiderados, pois, uma substância capaz de induzir danos cromossômicos em plantas pode também oferecer risco para os outros organismos (Leme e Marin-Morales, 2009).

2.5.2. Teste de mutagenicidade com *Salmonella Typhimurium* (Teste de Ames)

Os princípios do teste de mutagenicidade com *Salmonella Typhimurium* foi publicado por Ames e Yamasaki (1971), utilizando cepas mutantes de *S. Typhimurium* deficientes na síntese do aminoácido histidina, para avaliar o potencial carcinogênico de compostos químicos (Maron e Ames, 1983).

O ensaio consiste na utilização de linhagens de *S. Typhimurium* auxotróficas para o aminoácido histidina (his^-), tais linhagens possuem diferentes mutações no

operon deste aminoácido, assim, essas linhagens são incapazes de sintetizá-lo, sendo incapazes de crescer e formar colônias na sua ausência (Mortelmans e Zeiger, 2000).

O surgimento de novas mutações no local dessas mutações pré-existentes, e em regiões próximas a estes genes, podem restaurar a função do gene e permitir que as células sintetizem novamente a histidina, assim estas células mutadas podem crescer normalmente na ausência de histidina e formar colônias (Umbuzeiro e Vargas, 2003).

As cepas contêm ainda outras mutações que aumentam a capacidade em detectar mutágenos, além da mutação para histidina. A perda parcial da membrana de lipopolissacarídeo, causada pela mutação *rfa*, aumenta a permeabilidade da membrana, permitindo a entrada de grandes moléculas, que não penetrariam normalmente na membrana (Maron e Ames, 1983).

A mutação *uvrB* é uma deleção em um gene que codifica o sistema de reparo por excisão, diminuindo a capacidade de reparo do ácido desoxirribonucleico (DNA) e aumentando a sensibilidade na detecção de mutágenos. Esta deleção estendeu-se até o gene de síntese de biotina, conseqüentemente, as bactérias necessitam de biotina para seu crescimento, apenas a cepa TA102 não contém esta mutação (Maron e Ames, 1983).

As linhagens TA97a e TA98 detectam mutações do tipo *frameshift*, TA100 detecta substituições de pares de bases e TA102 também detectam mutações do tipo *frameshift* e possui a mutação *hisG428*, que aumenta os sítios específicos para mutagênese e detecta vários mutágenos que dificilmente são detectados nas outras cepas como, formaldeído, hidroperóxidos, bleomicina e mitomicina C (Maron e Ames, 1983).

As linhagens TA98 e TA100 são as mais utilizadas em avaliação de compostos, mostrando-se eficientes na detecção de vários agentes mutagênicos. Os objetivos do teste, os resultados alcançados e a quantidade de amostra disponível para ser testada, irão determinar o acréscimo de outras linhagens no ensaio. Segundo Mortelmans & Zeiger (2000) para fins de regulação, a bateria mínima utiliza as linhagens TA98, TA100, TA97a ou TA1537 e, frequentemente, TA1535 ou TA102, cada linhagem irá apresentar características genéticas adicionais que aumentam a sensibilidade na detecção de agentes mutagênicos.

As linhagens utilizadas no teste não apresentam enzimas de metabolização, que a exemplo nos mamíferos, são utilizadas para metabolização de compostos para sua redução e assimilação ou eliminação (Mortelmans e Zeiger, 2000). Para superar essa

dificuldade, foi incluída no teste a chamada fração S9, que é adicionada às culturas durante os ensaios, a fração S9 contém enzimas de metabolização obtida a partir do fígado de ratos, esta enzima permite a identificação de compostos com ação indireta (Maron e Ames, 1983).

O teste de Ames foi desenvolvido para detectar mutações induzidas quimicamente, sendo utilizado em todo o mundo como um teste preliminar para determinar o potencial mutagênico de novos produtos químicos e drogas. Para utilização do teste por empresas e laboratórios, diversas normas internacionais foram desenvolvidas, a fim de se garantir a uniformidade de procedimentos do teste antes da apresentação de dados para as agências reguladoras, para o registro ou a aceitação de muitos produtos químicos (FDA, 2012; ISO, 2014).

O teste de Ames é considerado um ensaio que possui grande sensibilidade na detecção do potencial mutagênico de diferentes agentes químicos, sendo um teste padronizado e intensamente utilizado pela comunidade científica internacional. Porém, este teste detecta vários tipos de mutações de ponto viáveis que envolvem poucos pares de base do DNA, em um genoma bacteriano simples, assim, muitos estudos complementam o teste utilizando outros ensaios com a utilização de animais (mamíferos principalmente) e teste *in vitro* com linhagens celulares humanas e de outros organismos.

2.5.3. Avaliação da atividade hemolítica

Metodologias *in vitro* têm sido utilizadas para determinação do potencial tóxico e mutagênico de produtos naturais. Ensaios *in vitro* podem desempenhar um papel vital na avaliação de extratos vegetais, podendo ser utilizados na triagem comparada, estudos de interação, bioatividade e caracterização biológica (Agarwal et al., 2014).

O teste de avaliação da atividade hemolítica é um dos testes, dentre os testes *in vitro*, que apresenta maior simplicidade na execução e os resultados são alcançados com maior rapidez. A ruptura do eritrócito com liberação de hemoglobina caracteriza o processo de hemólise.

Diversas metodologias são utilizadas para a verificação da atividade hemolítica de compostos naturais e sintéticos. Inicialmente, o teste era realizado através da avaliação qualitativa por observação de coloração vermelha decorrente da liberação de

hemoglobina, metodologia esta preconizada na época pela Organização Mundial de Saúde (OMS, 1998). Outra alternativa, é o método de observação de formação de halos de hemólise em placas de ágar sangue (Efing, 2008). A Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA recomenda o teste através da observação da absorbância da hemoglobina em ultravioleta (ANVISA, 2003).

2.5.4. Toxicidade aguda

Os ensaios de toxicidade aguda avaliam os efeitos adversos que ocorrem em um curto período de tempo, após administração única ou múltipla, de elevadas doses do composto a ser avaliado em animais. Os primeiros estudos utilizando o teste de toxicidade aguda ocorreram na década de 1920, neste período os estudos tinham como objetivo avaliar substâncias que seriam utilizadas em seres humanos, na década de 1970 os estudos passam a comparar e classificar a toxicidade de substâncias, tornando-se pré-requisito para as agências reguladoras responsáveis pela aprovação de novos fármacos, aditivos alimentares, ingredientes cosméticos, produtos domésticos, químicos industriais e pesticidas (Valadares, 2007).

A toxicidade aguda expressa a potência das substâncias em termos da dose letal média (DL_{50} dose letal 50% - dose que mata 50% dos animais) ou da concentração letal média (CL_{50} concentração letal 50% - concentração que mata 50% dos animais) valores estes que representam a dose estimada que cause a morte em 50% dos animais expostos ao produto testado (OECD, 2001). Outros parâmetros considerados neste teste é a avaliação da perda de massa corporal durante a exposição do composto estudado e a presença de sinais clínicos de toxicidade, como diarreia, piloereção, variações no comportamento e sangramento (Kapoor et al., 2014). A administração das substâncias pode ser por diferentes vias, dentre elas a dérmica, a oral e a inalatória.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivos Geral

Determinar a atividade antimicrobiana e avaliar os extratos etanólico de casca e folhas de *M. urundeuva* através dos testes de mutagenicidade, genotoxicidade, citotoxicidade e toxicidade.

3.2. Objetivos Específicos

Determinar a Concentração Inibitória Mínima dos extratos da casca e folhas de *M. urundeuva* frente a micro-organismos de interesse clínico.

Analisar a presença de compostos fenólicos nos extratos etanólico da casca e folhas de *M. urundeuva*.

Avaliar a toxicidade, citotoxicidade, mutagenicidade e genotoxicidade dos extratos etanólico da casca e folhas e de *M. urundeuva*.

REFERÊNCIAS

- Almeida, A.C., Sobrinho, E.M., Pinho, L. De, Martins, E.R., Duarte, E.R., Brandi, I.V., Cangussu, A.S., 2010. Toxicidade aguda dos extratos hidroalcoólicos das folhas de alecrim-pimenta, aroeira e barbatimão e do farelo da casca de pequi administrados por via intraperitoneal. *Ciência Rural* 40, 1, 200-3.
- Agarwal, A., D'Souza, P., Johnson, T.S., Dethe, S.M., Chandrasekaran, C.V., 2014. Use of in vitro bioassays for assessing botanicals. *Current opinion in biotechnology* 25, 39-44.
- Agência Nacional de Vigilância Sanitário (ANVISA)., 2003. Guia para avaliação de segurança de produtos cosméticos. Brasília. Disponível em: <www.anvisa.gov.br/cosmeticos/guia/guia_cosmeticos_final_2.pdf>. Acesso em: 02 fev. 2015.
- Akiyama, H.; Fujii, K.; Yamasaki, O.; Oono, T.; Iwatsuki, K., 2001. Antibacterial action of several tannins against *Staphylococcus aureus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 48, 487-491.
- Ames, B.N.; Yamasaki, E., 1971. The detection of chemical mutagens with enteric bacteria. In: *Chemical mutagens: principles and methods for their detection*. Plenum Press, New York.
- Andrade, M.W.; Luz, J.M.Q.; Lacerda, A.S.; Melo, P.R.A., 2000. Micropropagação da aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All.). *Ciência e Agrotecnologia* 24, 174-180.
- Bagatini, M, Silva, A.C.F., Tedesco, S.B., 2007. Uso do sistema teste de *Allium cepa* como bioindicador de genotoxicidade de infusões de plantas medicinais. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 17,444-447.
- Barroso, G.M. Sistemática de angiospermas do Brasil., 1991. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa 2, 377.
- Brasil., 2004. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RE nº 90 de 16 de março de 2004. Brasília, 18 mar. 2004. Disponível em: <<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=10242&word=>>>. Acesso em 20 fev. 2015.
- _____, 2009. Ministério da Saúde. Programa Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos.. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/plantas_mediciniais.pdf>. Acesso em: 04 fev.2015.
- _____, 2010. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – RDC nº 10, de 09 de março. Brasília, 09 mar. 2010. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2010/res0010_09_03_2010.html>. Acesso em: 20 fev. 2015.

- _____, 2011. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Fitofármaco – RDC – 24 de 14 de junho de 2011. Brasília, 14 jun. 2011. Disponível em:
<<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/2b2dff004515f81b82f3f796514d51c4/RDC+2411.pdf?MOD=AJPERES>>. Acesso em: 20 fev. 2015.
- _____, 2012. Ministério da Saúde. Fitoterápicos são alternativas de tratamento no SUS. Disponível em:<<http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/noticia/8061/162/fitoterapicossao-alternativa-de-tratamento-no-sus.html>>. Acesso em: 06 fev.2015.
- Cabrera, G.L., Rodriguez, D.M.G., 1999. Genotoxicity of soil from farmland irrigated with wastewater using three plant bioassays. *Mutation Research* 426, p.211–214.
- Carneiro, F.M., Silva, M.J.P.D., Borges, L.L., Albernaz, L.C., Costa, J.D.P., 2014. Tendências dos estudos com plantas medicinais no Brasil. *Revista Sapiência: sociedade, saberes e práticas educacionais* 3, 44-75.
- Carneiro, M.R.B., Santos, M.L., 2014. Importância relativa de espécies com potencial uso medicinal na flora do Centro Oeste do Brasil. *Fronteiras: Journal of Social, Technological and Environmental Science* 3, 145-163.
- Cuchiara, C.C., Borges, C.S., Bobrowski, V.L., 2012. Sistema teste de *Allium cepa* como bioindicador da citogenotoxicidade de cursos d'água. *Tecnologia & Ciência Agropecuária* 6, 33-38.
- Cunha, F.P.; Costa, L.J.L.; Fernandes, A.J.D.; Souza, T.P.; Soares, L.A.L., 2009. Development and optimization of extractives from *Astronium urundeuva* (Allemão) Engl. by factorial design. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 52, 647-652.
- Cushnie, T.P., Lamb, A.J., 2005. Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents* 26, 343-356.
- Dias, M.G., Canto-Dorow, T.S., Coelho, A.P.D., Tedesco, S.B., 2014. Efeito genotóxico e antiproliferativo de *Mikania cordifolia* (L. F.) Willd. (Asteraceae) sobre o ciclo celular de *Allium cepa* L.. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais* 16, 202-208.
- Efing, L.M.A.C., 2008. Compostos bioativos do material resinoso, subproduto do processamento da erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. –Hil.). 2008. 108. Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Paraná.
- El-Shahaby, O.A.; Abdel Migid, H.M.; Soliman, M.I.; Mashaly, I.A., 2003. Genotoxicity screening of industrial wastewater using the *Allium cepa* chromosome aberration assay. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 6, 23–28.
- Fatima, R.A., Ahmad, M., 2006. Genotoxicity of industrial wastewaters obtained from two different pollution sources in northern India: a comparison of three bioassays.

- Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis 609, 81-91.
- Feretti, D., Zerbini, I., Zani, C., Ceretti, E., Moretti, M., Monarca, S., 2007. *Allium cepa* chromosome aberration and micronucleus tests applied to study genotoxicity of extracts from pesticide-treated vegetables and grapes. Food additives and contaminants 24, 561-572.
- Fernandes, T.C.C.; Mazzeo, D.E.C.; Marin-Morales, M.A., 2007. Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. Pesticide Biochemistry and Physiology 88, 252-259.
- Figueredo, F.G., Lucena, B.F., Tintino, S. R., Matias, E.F., Leite, N.F., Andrade, J.C., Rodrigues, F.F., 2014. Chemical composition and evaluation of modulatory of the antibiotic activity from extract and essential oil of *Myracrodruon urundeuva*. Pharmaceutical Biology 52, 560-5.
- Fiskesjö, G., 1994. *Allium* Test II: Assesmente of chemical's genotoxic potential by recording aberrations in chromosomes and cell divisions in root tips of *Allium cepa* L. Environmental Toxicology and Water Quality 9, 235-241.
- Food and Drug Administration (FDA)., 2012. Guidance on genotoxicity testing and data interpretation for pharmaceuticals intended for human use S2 (R1). In: International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. ICH Expert Working Group. 31. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/default.htm>>. Acesso em: 18 fev. 2015.
- Grant, W.F., 1999. Higher plant assays for the detection of chromosome aberrations and gene mutations—a brief historical background on their use for screening and monitoring environmental chemicals. Mutation Research 426, 107–112.
- Hassan, S.M.; Haq, A.U.; Byrd, J.A.; Berhow, M.A.; Cartwright, A.L.; Bailey, C.A., 2010. Haemolytic and antimicrobial activities of saponin-rich extracts from guar meal. Food chemistry 119, 600-605.
- Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA)., 2008. Lista oficial de espécies da flora brasileira ameaçada de extinção. Instrução Normativa. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/estruturas/ascom_boletins/_arquivos/83_19092008034949.pdf>. Acesso em: 12 jan. 2015.
- International Organization of Standardization (ISO)., 2014. ISO 10993-3: 2014: Biological evaluation of medical devices— Part 3: Tests for genotoxicity, carcinogenicity, and reproductive toxicity. Arlington: Association for the Advancement of Medical Instrumentation. 30.

- Jandú, J.J., Silva, L.C.N., Pereira, A.D.P.C., Souza, R.M., Silva Junior, C.A., Figueiredo, R.C.B. Q., Araujo, J.M., Silva, M.V., 2013. *Myracrodruon urundeuva* bark: an antimicrobial, antioxidant and non-cytotoxic agent. *Journal of Medicinal Plants Research* 7, 413-418.
- Kapoor, U., Srivastava, M.K., Trivedi, P., Garg, V., Srivastava, L.P., 2014. Disposition and acute toxicity of imidacloprid in female rats after single exposure. *Food and Chemical Toxicology* 68, 190-195.
- Kato, E.T.M., Akisue, G., 2002. Estudo farmacognóstico de cascas *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. *Revista Lecta* 20, 69-76.
- Khalil, A.H., Ei-Adawy, T.A., 1994. Isolation, identification and toxicity of saponin from different legumes. *Food Chemistry* 50, 197-201.
- Kirsch-Volders, M., Vanhauwaert, A., Eichenlaub-Ritter, U., Decordier, I., 2003. Indirect mechanisms of genotoxicity. *Toxicology Letters* 140-141, 63-74.
- Leme, D.M., Marin-Morales, M.A., 2009. *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. *Mutation Research* 682, 71-81.
- Levan, A., 1938. The effect of colchicine on root mitoses in *Allium*. *Hereditas* 24, 471-486.
- Levan, A. 1949. The influence on chromosomes and mitoses of chemicals, as studied by the *Allium* test. - Proc. Eighth Int. Congr. Genet. *Hereditas*, sup. vol., 325-337.
- Lorenzi, H., 1992. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Plantarum, Nova Odessa.
- Lorenzi, H., Matos, F.J.A., 2008. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. Plantarum, 2.ed. Nova Odessa.
- Maron, D.M., Ames, B.N., 1983. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutation Research* 113, 173-215.
- Mateuca, R., Lombaert, N., Aka, P.V., Decordier, I., Kirschvolders, M., 2006. Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring. *Biochimie*, Paris 88, 1515-1531.
- McChesney, J.D., Venkataraman, S.K., Henri, J.T., 2007. Plant natural products: back to the future or into extinction? *Phytochemistry* 68, 2015-22.
- Mendanha, D.M., Ferreira, H.D., Felício, L.P., Silva, E.M., Pereira, D.G., Nunes, W.B., Carvalho, S., 2010. Modulatory effect of *Byrsonima verbascifolia* (Malpighiaceae) against damage induced by doxorubicin in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Genetics and Molecular Research* 9, 69-77.

- Monarca, S., Feretti, D., Zerbini, I., Alberti, A., Zani, C., Resola, S., Gelatti, U., Nardi, G., 2002. Soil contamination detected using bacterial and plant mutagenicity tests and chemical analyses. *Environmental Research* 88, 64-69.
- Mortelmans, K., Zeiger, E., 2000. The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. *Mutation Research, Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 455, 29–60.
- Nickels, S., Truong, T., Hein, R., Stevens, K., Buck, K., Behrens, S., ...; Smeets, D., 2013. Evidence of gene–environment interactions between common breast cancer susceptibility loci and established environmental risk factors. *PLoS Genetics* 9, e1003284.
- Oliveira Júnior, S.R., Conceição, G.M., 2010. Espécies vegetais nativas do Cerrado utilizadas como medicinais pela comunidade Brejinho, Caxias, Maranhão, Brasil. *Cadernos de Geociências* 7.
- Organização Mundial da Saúde (OMS), 1998. Quality control methods for medicinal plants methods. 41 – 43. Disponível em: <<http://apps.who.int/iris/handle/10665/41986>>. Acesso em: 01 fev. 2015.
- Organization for Economic Cooperation and Development (OECD), 2001. Guidelines for the testing of chemicals: Acute Oral Toxicity – Fixed Dose Procedure. Paris: OECD, Guideline 420. Disponível em: <http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-420-acute-oral-toxicity-fixed-dose-procedure_9789264070943-en>. Acesso em: 20 jan. 2015.
- Östling, O.; Johanson, K.J., 1984. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 123, 291–298.
- Palacio, S.M., Espinoza-Quiñones, F.R., Galante, R.M.; Zenatti, D.C., Seolatto, A.A., Lorenz, E.K., Zacarkim, C.E., Rossi, N., Rizzutto, M.A., Tabacniks, M.H., 2005. Correlation between heavy metal ions (Copper, Zinc, Lead) concentrations and root length of *Allium cepa* L. in polluted river water. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 48, 191-196.
- Pinho, L., Suoza, P.N.S., Sobrinho, E.M., Almeida, A.C., Ernane, R.M., 2012. Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcoolicos das folhas de alecrim-pimenta, aroeira, barbatimão, erva baleeira e do farelo da casca de pequi. *Ciência Rural* 42, 326-331.
- Rank, J., 2003. The method of *Allium* anaphase-telophase chromosome aberration assay. *Ekologija* 1, 38–42.
- Rank, J., Nielsen, M.H., 1997. *Allium cepa* anaphase–telophase root tip chromosome aberration assay on N-methyl-N-nitrosourea, maleic hydrazide, sodium azide, and ethyl methanesulfonate. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 390, 121-127.

- Rates, S.M.K., 2001. Plants as source of drugs. *Toxicicon* 39, 603-613.
- Ribeiro, D.A., Oliveira, L.G.S., Macêdo, D.G., Menezes, I.R.A., Costa, J.G.M., Silva, M.A.P., ...; Almeida, M.M.S., 2014. Promising medicinal plants for bioprospection in a Cerrado area of Chapada do Araripe, Northeastern Brazil. *Journal of Ethnopharmacology* 155, 1522-1533.
- Ribeiro, L.R., Salvadori, D.M.F., Marques, E. K., 2003. *Mutagênese Ambiental*, Ulbra, Canoas.
- Riss, T.L., Moravec, R.A., 2004. Use of multiple assay endpoints to investigate the effects of incubation time, dose of toxin, and plating density in cell-based cytotoxicity assays. *Assay and Drug Development Technologies* 2, 51-62.
- Rizzini, C.T., 1971. *Árvores e madeiras úteis do Brasil. Manual de dendrologia brasileira*, Edgard Blücher, São Paulo.
- Rogero, S.O., Lugao, A.B., Ikeda, T.I., Cruz, A.S., 2003. Teste *in vitro* de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. *Materials Research* 6, 317-320.
- Salis, S.M., Crispim, S.M.A., 2006. Densidade de árvores listadas como ameaçadas de extinção na Bacia do Alto Paraguai, Embrapa Pantanal, Corumbá.
- Santin, D.A., Leitão-Filho, H.F., 1991. Restabelecimento e revisão taxonômica do gênero *Myracrodruon* Freire Allemão (Anacardiaceae). *Revista Brasileira de Botânica* 14, 133-145.
- Saslis-Lagoudakis, C.H., Savolainen, V., Williamson, E.M., Forest, F., Wagstaff, S.J., Baral, S.R., ...; Hawkins, J. A., 2012. Phylogenies reveal predictive power of traditional medicine in bioprospecting. *PNAS* 109, 15835-40.
- Schimid, W., 1975. The Micronucleus Test. *Mutation Research* 31, 9-15.
- Schippmann, U., Leaman, D.J., Cunningham, A.B., 2002. Impact of Cultivation and Gathering of Medicinal Plants on Biodiversity: Global Trends and Issues. In: *Biodiversity and the Ecosystem Approach in Agriculture, Forestry and Fisheries. Satellite Event on the Occasion of the Ninth Regular Session of the Commission on Genetic Resources for Food and Agriculture (FAO)*, Rome.
- Silva, C.R., Monteiro, M.R., Rocha, H.M., Ribeiro, A.F., Caldeira, A.A., Leitão, A.C., Bezerra, R. J. A.C., Pádula, M., 2008. Assessment of antimutagenic and genotoxic potential of senna (*Cassia angustifolia* Vahl.) aqueous extract using *in vitro* assays. *Toxicology in vitro* 22, 212-218.
- Takahashi, H., Kosaka, M., Watanabe, Y., Nakade, K., Fukuyama, Y., 2003. Synthesis and neuroprotective activity of bergenin derivatives with antioxidant activity. *Bioorganic Med. Chem.* 11, 1781-1788.

- Tomasetti, C., Vogelstein, B., 2015. Variation in cancer risk among tissues can be explained by the number of stem cell divisions. *Science* 347, 78-81.
- Turolla, M.S.R., Nascimento, E.S., 2006. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. *Revista Brasileira Ciência Farmacêutica* 42.
- Umbuzeiro, G.A., Vargas, V.M.F., 2003. Teste de mutagenicidade com *Salmonella* Typhimurium (Teste de Ames) como indicador de carcinogenicidade em potencial para mamíferos. In: Ribeiro, L.R.; Salvadori, D.M.F.; Marques, E.K. (Org.). *Mutagênese Ambiental*, Ulbra, Canoas, pp.81-112.
- Ustulin, M., Figueiredo, B.D.B., Tremea, C., Pott, A., Pott, V.J., Bueno, N.R., Castilho, R.O., 2009. Revisão plantas medicinais comercializadas no Mercado Municipal de Campo Grande-MS. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 19, 805–813.
- Valadares, M.C., 2007. Avaliação da toxicidade aguda: estratégias após a “era do teste DL50”. *Revista Eletrônica de Farmácia* 3.
- Varanda, E.A., 2006. Atividade mutagênica de plantas medicinais. *Revista de Ciências Farmacêuticas básica e aplicada* 2, 1-7.
- World Health Organization (WHO)., 2003. Guidelines on good agricultural and collection practices (GACP) for medicinal plants. Geneva: World Health Organization. Disponível em:
<<http://whqlibdoc.who.int/publications/2003/9241546271.pdf>>. Acesso em: 12 jan. 2015.

4. ARTIGO

***Myracrodruon urundeuva*: atividade antimicrobiana e avaliação toxicológica pelos testes de Ames, *Allium cepa*, atividade hemolítica e toxicidade aguda.**

XXXXXXXX¹; XXXXXXXX²; XXXXXXXX³; XXXXXXXX⁴

Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental

Universidade Federal da Grande Dourados – UFGD

Laboratório de Microbiologia Aplicada

Resumo

Relevância etnofarmacológica: O uso de plantas medicinais não se baseia em estudos que comprovem a sua eficácia e segurança. *Myracrodruon urundeuva* é uma planta nativa do Brasil utilizada pela população indígena e não indígena no tratamento de infecções, apresentando ação adstringente, cicatrizante e no tratamento da gastrite e úlcera. O objetivo do trabalho foi verificar a atividade antimicrobiana dos extratos da casca e folhas de *M. urundeuva* e avaliar a toxicidade, citotoxicidade, mutagenicidade e genotoxicidade.

Materiais e Métodos: Foi determinada a Concentração Inibitória Mínima dos extratos etanólicos e frações acetato de etila e hidroalcoólico da casca e folhas de *M. urundeuva*, os extratos que apresentaram atividade antimicrobiana foram caracterizados via cromatografia líquida e avaliados em testes toxicológicos. Para avaliação toxicológica foi realizado o teste de Ames, *Allium cepa*, avaliação da atividade hemolítica e teste de toxicidade aguda em ratos.

Resultados: Os extratos etanólicos da casca e folhas apresentaram atividade antimicrobiana, e foram considerados tóxicos e citotóxicos pelo teste em *A. cepa* (a partir da concentração 0,3 mg mL⁻¹) e de toxicidade aguda em ratos. Não foi observada atividade hemolítica em eritrócitos. Os extratos não apresentaram genotoxicidade e mutagenicidade pelo teste em *A. cepa* e de Ames. A caracterização química indicou a presença de flavonoides e taninos nos extratos etanólicos.

Conclusão: Extratos etanólicos da casca e folhas de *M. urundeuva* apresentam atividade antimicrobiana e não possuem atividade mutagênica, porém, apresentaram toxicidade. Os testes em *A. cepa* e de Ames apresentaram similaridade entre os resultados. Foi observada similaridade nos resultados entre o teste em *A. cepa* e de toxicidade aguda em ratos. Com base nos testes utilizados, os extratos etanólicos da casca e folhas de *M. urundeuva* apresentam citotoxicidade e toxicidade, não sendo indicada a sua ingestão.

Palavras chaves: fitoterápicos; citotoxicidade; mutagênese; toxicologia.

1. Introdução

A avaliação da atividade antimicrobiana, toxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade de extratos vegetais utilizados na medicina tradicional, constituem importantes ferramentas na prevenção a saúde da população que fazem uso destes extratos. Vários estudos são direcionados à descoberta de novos agentes bioativos originados de extratos vegetais e outros produtos naturais que, apresentem maior eficiência no tratamento de doenças e menor toxicidade (Bagiu et al., 2012; Eren e Özata, 2014; Gehrke et al., 2013). Laboratórios e indústrias farmacêuticas buscam novas estruturas ativas ou com atividades complementares às drogas já existentes, para tratamento de infecções ou ação contra micro-organismos multirresistentes (Varanda, 2006).

Myracrodruon urundeuva é conhecida popularmente como aroeira, e pode ser encontrada nas Regiões Nordeste, Sudeste e Centro-Oeste do Brasil até a Bolívia, Paraguai e Argentina (Lorenzi e Matos, 2008). Na medicina tradicional, a planta é utilizada no tratamento de várias doenças, sendo observado o uso por populações indígenas e não indígenas do Brasil, sob a forma de semicúprio (“banho-de-assento”) após o parto e no tratamento de infecções vaginais (Cunha et al., 2009), como adstringente, anti-inflamatório, cicatrizante e no tratamento da gastrite e úlcera (Oliveira Júnior e Conceição, 2010). Pesquisas apontam que esta planta possui atividade antimicrobiana, porém indicam que ela pode ser tóxica (Almeida et al., 2010; Jandú et al., 2013; Ustulin et al., 2009).

Diferentes ensaios biológicos são utilizados para avaliação da toxicidade de uma planta, cada ensaio apresenta tipos celulares e características diferentes. A avaliação toxicológica utilizando diferentes metodologias é recomendada para garantir maior segurança nos resultados obtidos (Brasil, 2013; WHO, 2005). Os testes comumente utilizados são: teste de Ames – (Maron e Ames, 1983); teste em *Allium cepa* (Fiskesjö, 1994); avaliação da atividade hemolítica (Khalil e Ei-Adawy, 1994) e toxicidade aguda em ratos (OECD, 2001). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), produtos a base de plantas devem ser investigados sobre sua toxicidade, por meio de testes *in vitro* (teste de Ames e cultura de células) para avaliar a genotoxicidade, mutagenicidade e citotoxicidade, e em ratos para avaliar a toxicidade aguda e a dose máxima tolerada (WHO, 2005).

O teste em *Allium cepa*, apresenta alta sensibilidade para detectar agentes mutagênicos e permite avaliar mecanismos genéticos distintos como, mutações pontuais, aberrações e quebras cromossômicas (Leme e Marin-Morales, 2009). Testes em vegetais também permitem avaliar a toxicidade e citotoxicidade de extratos vegetais (Eren e Özata, 2014; Paz et al., 2013). Outro teste simples e rápido de avaliação citotóxica é o de avaliação da atividade hemolítica, que avalia a capacidade de determinada substância causar hemólise (Jandú et al., 2013).

Os testes de toxicidade aguda são pré-requisitos para as agências internacionais responsáveis pela aprovação de novos fármacos, aditivos alimentares, cosméticos, produtos domésticos, químicos industriais e pesticidas (Valadares, 2006). No Brasil a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), com base em protocolos de agências regulamentadoras internacionais, estabelece o teste de toxicidade aguda como parte dos testes de avaliação da segurança de plantas medicinais (Brasil, 2013).

O teste de Ames constitui um método eficiente e rápido para detectar mutações genéticas, e foi incluído como parte dos ensaios internacionalmente propostos para registro de medicamentos, outras drogas e formulações químicas (FDA, 2012; ISO, 2014). O teste de Ames baseia-se em linhagens de *S. Typhimurium* derivadas da parental LT2, auxotróficas para o aminoácido histidina (his-). Na presença de agentes mutagênicos, estas linhagens sofrem mutações que revertem seu caráter de auxotrofia, passando assim a formar colônias em meio desprovido desse aminoácido (Maron e Ames, 1983; Mortelmans e Zeiger, 2000). Além da avaliação da atividade mutagênica, o teste de Ames também é utilizado para avaliar a atividade antimutagênica dos compostos (Resende et al., 2012).

Muitos compostos avaliados que não apresentam atividade mutagênica podem apresentar atividade citotóxica e tóxica. Neste sentido, o estudo de plantas utilizadas como medicinais exigem uma abordagem que contemple diversas metodologias de avaliação toxicológica. *M. urundeuva* é utilizada como medicinal, porém, pouco se conhece quanto sua atividade. O objetivo do presente estudo foi avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos de *M. urundeuva* e sua toxicidade utilizando os testes de Ames, *Allium cepa*, atividade hemolítica e de toxicidade aguda em ratos.

2. Material e Métodos

2.1 Material Vegetal

As cascas e as folhas da *M. urundeuva* foram coletadas na área da Fazenda Experimental da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), Dourados – Mato Grosso do Sul – Brasil, coordenadas S 22° 14' 877 W 54' 59' 615. Exsicatas da espécie foram identificadas pela professora Dr. Zefa Valdivina Pereira e depositadas no Herbário da Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, da Universidade Federal da Grande Dourados sob número de registro 534.

2.2 Preparo dos extratos

As cascas e folhas foram secas em estufa de ar circulante à temperatura de 40°C, após a secagem o material foi pulverizado em moinho de facas, pesado e armazenado em local seco sem umidade. O material seco e pulverizado foi misturado a aproximadamente 900mL de álcool etílico absoluto e deixado à temperatura de 25°C por 48h, com agitações ocasionais. Após ser filtrado, o álcool etílico dos extratos vegetais foi completamente evaporado à 35°C em evaporador rotativo, sendo posteriormente liofilizados.

Para obtenção das partições líquido-líquido dos extratos etanólicos da casca e folhas, foram utilizados solventes de polaridade crescente (acetato de etila e clorofórmio), sendo ao final obtida a fração hidroalcoólica e acetato de etila da casca e folhas de *M. urundeuva*. Após a separação dos extratos e frações, estes foram testados quanto suas possíveis atividades antimicrobianas.

2.3 Ensaio de atividade antimicrobiana

2.3.1 Micro-organismos

A atividade antimicrobiana foi avaliada utilizando micro-organismos da American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA). As cepas ATCC utilizadas foram *Candida albicans* 90028, *Candida krusei* 6258, *Candida tropicalis* 750, *Candida glabrata* 2001, *Escherichia coli* 25922, *Enterococcus faecalis* 51299, *Staphylococcus aureus* 29213 e *Pseudomonas aeruginosa* 27853.

2.4.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos extratos

A Concentração Inibitória Mínima foi determinada pela técnica de microdiluição em caldo, com algumas adaptações para utilização de produtos naturais (CLSI, 2008). Os extratos etanólicos e as frações acetato de etila e hidroalcoólica da casca e folhas foram dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich®) e, em seguida, diluições sucessivas (1:2) do extrato foram realizadas em microplacas de 96 poços. As concentrações foram de $4\mu\text{g mL}^{-1}$ a $2048\mu\text{g mL}^{-1}$. A suspensão de cada microorganismo testado foi ajustada na concentração de 0,5 de McFarland (10^8 UFC mL^{-1}) e os meios de cultura utilizados foram RPMI-1640 (Sigma-Aldrich®) e caldo Müller Hinton (Himedia®) para leveduras e bactérias, respectivamente. As microplacas foram incubadas por 48h a 37°C para leveduras e por 24h a 35°C para as bactérias. A CIM foi definida como a menor concentração que inibiu crescimento fúngico e bacteriano.

2.3.3 Concentração Fungicida Mínima (CFM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM)

Concentração Fungicida Mínima e Concentração Bactericida Mínima foram determinadas em placas de Petri contendo ágar Sabouraud Dextrose para as leveduras e ágar Müeller Hinton para bactérias. Alíquotas de cada poço das microplacas foram retiradas com palitos esterilizados e perfurados nas placas de Petri com o meio de cultura. As placas foram incubadas por 48h a 37°C para as leveduras e 24h a 35°C para as bactérias. As CFM e CBM foram definidas como a menor concentração que não apresentou crescimento fúngico e bacteriano, respectivamente (Bagiu et al., 2012). Os extratos que apresentaram atividade antimicrobiana foram avaliados nos demais testes.

2.4 Análise dos extratos via cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), com detector de arranjo de diodos (DAD)

Os extratos etanólicos da casca e folhas foram analisados no Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (CLAE) modelo: VARIAN 210, detector de arranjo de diodos (DAD), com varredura entre 200-800nm. Coluna Phenomenex C-18 (\varnothing 4,6mm x || 250mm, diâmetro da partícula $10\mu\text{m}$) e pré-coluna (25mm x 3mm) de mesma fase da coluna. Eluição realizada em sistema gradiente: MeOH/H₂O de 5 a 100% metanol, levando 15 minutos para atingir 100% de metanol, 100% de metanol por 5 min e 5 min para voltar à condição inicial, sendo 25 min de análise total. Vazão de fluxo da bomba

de 1 mL min^{-1} e volume injetado de $5\mu\text{L}$. As amostras foram filtradas com um microfiltro de $0,45\mu\text{m}$.

2.5 Ensaios em *Allium cepa*

2.5.1 Citotoxicidade

Cem sementes de *A. cepa* (Isla®) foram distribuídas em placas de Petri de vidro (100 x 15mm) tendo como substrato uma folha de papel-filtro umedecida com 3mL dos extratos etanólicos da casca e folhas de *M. urundeuva*. Água destilada foi utilizada como controle negativo e trifluralina (Nortox®) ($0,00084\text{g L}^{-1}$) como controle positivo (Fernandes et al., 2007). As concentrações avaliadas de cada extrato foram: 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 e 1mg mL^{-1} de cada extrato. Para a avaliação dos efeitos citotóxicos, o parâmetro analisado foi o índice mitótico nas células das raízes das sementes.

As raízes das sementes de *A. cepa* foram medidas ao longo dos cinco dias, e no quinto dia elas foram coletadas, pré-tratadas e fixadas em solução de Carnoy (álcool e ácido acético na proporção 3:1 v/v) por 24h, sendo posteriormente lavadas três vezes com água destilada, hidrolisadas em HCl 5 M por 10 min em banho-maria a 60°C , lavadas novamente e coradas com Reativo de Schiff por 45 min (na ausência de luz). Após esses procedimentos, o meristema da raiz foi cortado e colocado em uma lâmina junto com uma gota de Carmim acético 45%, sendo esmagado com uma lamínula.

Para determinar o índice mitótico (IM) utilizou-se a seguinte fórmula: $\text{IM} = \text{NCM}/\text{NTC} \times 100$, onde NCM = número de células em mitose e NTC = número total de células analisadas. Foram analisadas 1.000 células por lâmina em microscópio de luz com aumento de 40x, sendo para cada tratamento cinco lâminas, tendo um total de 5.000 células analisadas por tratamento.

2.5.2 Toxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade

Cem sementes de *Allium cepa* (Isla®) foram distribuídas em placas de Petri de vidro (100 x 15mm) tendo como substrato uma folha de papel-filtro umedecida com 3mL dos extratos etanólicos da casca e folhas de *M. urundeuva*. Água destilada foi empregada como controle negativo e trifluralina (Nortox®) ($0,00084\text{g L}^{-1}$) e formol 3% como controles positivo (Fernandes et al., 2007). As concentrações avaliadas dos extratos etanólicos da casca e folhas foram: 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 e 1mg mL^{-1} , durante cinco

dias. Os parâmetros analisados para toxicidade foram índice de germinação (IG) das sementes e tamanho médio (TM) das raízes das sementes, para avaliação da genotoxicidade foi utilizado o índice de alterações cromossômicas (IAC) e para mutagenicidade foi utilizado o índice de mutagenicidade (IMt) (Fernandes et al., 2007).

O índice de germinação foi determinado pela seguinte fórmula, $IG = NG/TS \times 100$, onde NG = número de sementes que germinaram e TS = total de sementes expostas ao tratamento. O tamanho médio das raízes foi determinado através de medidas realizadas ao longo dos cinco dias de tratamento.

O índice de alterações cromossômicas (perda de cromossomos, c-metáfase, ponte cromossômica, poliploidia e multipolaridade) foi estabelecido pela seguinte fórmula, $IAC = NCA/TC \times 100$, onde NCA = número de células alteradas e TC = total de células observadas. Para determinar o índice de mutagenicidade (IMt), utilizou-se a seguinte fórmula: $IMt = NCMn+NQC/TC \times 100$, onde NCMn = número de células que apresentaram micronúcleos, NQC = número de células que apresentaram quebra cromossômica e TC = total de células observadas. Assim como na avaliação do IM, foram analisadas 1.000 células por tratamento, sendo para cada tratamento cinco lâminas.

2.6 Teste de Ames

O teste foi conduzido de acordo com a metodologia de pré-incubação, desenvolvida por Maron e Ames (1983). A toxicidade foi evidenciada pela redução no número de revertentes his⁺ ou como um crescimento de fundo (*background*) nas placas teste de ágar mínimo glicosado (Mortelmans e Zeiger, 2000). As cepas de *Salmonella Typhimurium* utilizadas foram das linhagens TA97a, TA98, TA100 e TA102.

As concentrações avaliadas dos extratos etanólicos da casca e folhas foram 0,05; 0,09; 0,19; 0,28 e 0,38 $\mu\text{g placa}^{-1}$. Em cada concentração dos extratos foram adicionados 0,5mL de 0,2M de tampão fosfato e 0,1mL da suspensão bacteriana e incubados a 37°C por 30 min. Em seguida, foram adicionados à mistura 2mL de top ágar suplementado com traços de histidina e biotina. Homogeneizou-se levemente e plaqueou-se em meio mínimo glicosado. Após solidificação do top ágar, as placas foram incubadas a 37°C por 48h. Após esse período, as colônias revertentes foram contadas manualmente. O ensaio foi realizado em triplicata.

Os agentes mutagênicos padrões utilizados para confirmar as propriedades de reversão e especificidade de cada cepa em experimentos foram: Azida sódica ($1,25\mu\text{g placa}^{-1}$); 4-nitro-o-fenilenodiamina ($10\mu\text{g placa}^{-1}$) e Mitomicina C ($0,5\mu\text{g placa}^{-1}$). Como controle negativo foi utilizado DMSO ($100\mu\text{L placa}^{-1}$).

A concentração do extrato foi expressa em unidade de massa/placa. Os resultados foram avaliados através da razão de mutagenicidade (RM) conforme a fórmula abaixo:

RM = Número de revertentes da amostra teste / Número de revertentes do controle negativo

A amostra foi considerada mutagênica quando houve um aumento significativo do número de revertentes induzidos e a RM foi maior ou igual a dois em pelo menos uma das concentrações testadas (Mortelmans e Zeiger, 2000).

2.7 Avaliação da Atividade Hemolítica *in vitro*

O sangue (5-10mL) foi obtido por punção venosa de um voluntário não fumante e saudável que concordou com a coleta do sangue e assinou o termo de consentimento livre e esclarecido.

Os eritrócitos foram imediatamente isolados a partir do sangue por centrifugação a 1500rpm durante 10 min. Após a remoção do plasma os eritrócitos foram lavados três vezes com solução salina tamponada com fosfato (PBS; pH 7,4) e depois preparada uma suspensão de eritrócitos a 1%, com a utilização do mesmo tampão (adaptado de Khalil e Ei-Adawy, 1994).

A avaliação da atividade hemolítica dos extratos etanólicos da casca e folhas foram realizadas *in vitro*. Cada tubo recebeu 1,1ml da suspensão de eritrócitos e 0,4ml de várias concentrações dos extratos (0,05; 0,1 e $0,5\text{mg mL}^{-1}$). O controle negativo foi o PBS (solvente) e o controle positivo *Quillaja saponina* (0,0025%) (Jandú et al., 2013). Após 60min de incubação à 37°C , as células foram centrifugadas e o sobrenadante foi usado para medir a absorvância da hemoglobina liberada em espectrofotômetro (comprimento de 540nm).

O valor da média foi calculado a partir do ensaio em triplicata. A atividade hemolítica foi calculada pela seguinte fórmula:

Atividade hemolítica (%) = $(A_e - A_n) / (A_n - A_p) \times 100$, onde A_e = absorvância na presença do extrato, A_n = absorvância do controle negativo (sem extrato), e A_p = absorvância do controle positivo.

2.8 Teste de toxicidade aguda

Vinte cinco ratas *Wistars* adultas (65 dias de idade, peso aproximadamente de 250g, n= 25), provenientes do Biotério da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), foram utilizadas para avaliar a toxicidade aguda dos extratos. Os animais foram mantidos sob condições controladas de luminosidade (12 horas de claro/ 12 horas de escuro) e temperatura (média de 23°C), recebendo água e ração comercial à vontade. O teste de toxicidade aguda foi realizado utilizando protocolo da OECD (Organization for Economic Co-operation and Development), Guideline 425 (29) e as diretrizes da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária).

Os animais foram distribuídos em cinco grupos experimentais (n= 5 animais/grupo), os quais foram tratados com 0 e 2000mg kg⁻¹ de peso corporal de extrato etanólico da casca e da folha de *M. urundeuva*. Os animais permaneceram em jejum 12h antes da administração dos extratos e os tratamentos foram realizados em dose única por via oral (gavage), e foram observados, nas primeiras horas e a cada 24h durante 14 dias. Foram analisados parâmetros comportamentais, como irritabilidade, contorção, reflexo de endireitamento, tremores, convulsões, piloereção, respiração e morte. Também foi avaliado o peso corporal e a quantidade de água e ração consumida pelo grupo durante os 14 dias de avaliação. No 15º dia, todos os animais dos grupos experimentais foram pesados e anestesiados com ketamina (25mg kg⁻¹) e xilazina (10mg kg⁻¹) e submetidos à eutanásia.

O Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFGD aprovou o procedimento experimental (protocolo nº 003/2012).

2.8.1 Análise Histológica

Todos os animais foram submetidos à necropsia no fim do experimento para analisar as características macroscópicas do fígado, pulmão e rim. Os órgãos foram retirados cuidadosamente e pesados individualmente e posteriormente fixados em formalina 10% tamponada, seccionados em micrótomo e montada lâminas histológicas.

Os cortes seccionados foram corados com hematoxilina-eosina. As lâminas foram analisadas em microscópio óptico de luz com aumento de 40x.

2.9 Análise estatística

A análise de dados foi feita por meio de estatística descritiva, utilizando os testes Mann-Whitney e ANOVA. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. Os dados foram computados e analisados através do Software BioEstat 5.0.

3. Resultados e Discussões

3.1 Atividade antimicrobiana

Extrato etanólico, frações acetato de etila e hidroalcoólica da casca de *M. urundeuva* apresentaram atividade inibitória mínima contra leveduras *C. albicans*, *C. krusei* e *C. tropicalis*, entre as concentrações 32 a $64 \mu\text{g mL}^{-1}$. O extrato etanólico e a fração hidroalcoólica das folhas de *M. urundeuva* apresentaram atividade inibitória contra *C. krusei* ($64 \mu\text{g mL}^{-1}$). Os extratos apresentaram atividade inibitória contra bactérias *E. faecalis* e *S. aureus*. Para as demais bactérias os extratos não apresentaram atividade (Tabela 1).

Tabela 1.

Concentração Inibitória Mínima (CIM), Concentração Fungicida Mínima (CFM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) dos extratos etanólico e frações da folha e casca de *M. urundeuva* frente a cepas da *American Type Culture Collection* (ATCC).

Extratos	E.E.C ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		E.A.E.C. ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		E.H.C ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		E.E.F. ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		E.A.E.F ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		E.H.F. ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	
	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM
<i>C. albicans</i>	64	128	64	64	32	128	+	+	+	+	+	+
<i>C. glabrata</i>	+	+	+	+	+	+	1024	2048	+	+	+	+
<i>C. krusei</i>	32	1024	64	512	64	+	64	2048	+	+	64	1024
<i>C. tropicalis</i>	64	128	64	128	32	256	512	1024	512	512	1024	2048

Extratos	E.E.C ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		E.A.E.C. ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		E.H.C ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		E.E.F. ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		E.A.E.F ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		E.H.F. ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
<i>E. coli</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>E. faecalis</i>	1024	1024	+	+	+	+	512	512	512	512	+	+

<i>S. aureus</i>	512	512	256	256	+	+	512	512	2048	2048	+	+
<i>P. aeruginosa</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Extrato Etanólico da Casca (E.E.C); Extrato Acetato de Etila da Casca (E.A.E.C); Extrato Hidroalcoólico da Casca (E.H.C); Extrato Etanólico da Folha (E.E.F); Extrato Acetato de Etila da Folha (E.A.E.F); Extrato Hidroalcoólico da Folha (E.H.F). Cepas utilizadas: *Candida krusei* ATCC 6258; *Candida glabrata* ATCC 2001; *Candida albicans* ATCC 90028; *Candida tropicalis* ATCC 750; *Escherichia coli* ATCC 25922; *Enterococcus faecalis* ATCC 51299; *Staphylococcus aureus* ATCC 29213; *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853; (+) Crescimento positivo.

Segundo Holetz (2002), considera-se que se a atividade do extrato testado na CIM for inferior a $100\mu\text{g mL}^{-1}$, sua atividade antimicrobiana será considerada boa, se a atividade antimicrobiana for de 101 a $500\mu\text{g mL}^{-1}$ é considerada mediana, a partir de 501 a $1000\mu\text{g mL}^{-1}$ a atividade antimicrobiana é considerada fraca; e mais de $1000\mu\text{g mL}^{-1}$ a ação do extrato é considerada inativa. Os resultados mostram que os extratos de *M. urundeuva* apresentam boa atividade antimicrobiana.

Jandú et al. (2013), encontraram ação inibitória do extrato metanólico da casca de *M. urundeuva* contra *Aspergillus niger*, *Bacillus subtilis*, *C. albicans*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Micrococcus luteus* e *S. aureus* entre as concentrações 390 a $3190\mu\text{g mL}^{-1}$. Podemos observar melhor atividade antimicrobiana em nosso trabalho, o que pode estar relacionado ao tipo de extração dos extratos, álcool etílico, variações da própria espécie, ou mesmo das condições ambientais onde ela cresceu.

A atividade antimicrobiana dos extratos de *M. urundeuva* pode ser atribuída à presença de flavonoides e taninos. Outros trabalhos mostraram a relação dos flavonoides e taninos com a atividade antimicrobiana desta espécie (Jandú et al., 2013; Siqueira et al., 2012; Araújo et al., 2008).

A presença da atividade antimicrobiana em plantas utilizadas como medicinais é muito importante, pois comprova sua eficácia no tratamento de infecções, porém, a presença desta atividade pode ser um indicativo que a planta possui substâncias tóxicas. Os flavonoides e taninos, além da atividade antimicrobiana, podem também apresentar toxicidade (Resende et al., 2012; Silva et al., 2014). Portanto, estudos sobre atividade antimicrobiana de plantas devem ser acompanhados de avaliações toxicológicas.

3.2 Análise dos extratos via cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

As análises utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) permitem verificar a presença de compostos fenólicos em extratos de plantas. Os

espectros de absorção UV vis de compostos fenólicos permitem sua identificação e classificação (Yan et al., 2012).

Os extratos etanólicos da casca e folhas de *M. urundeuva* apresentaram atividade antimicrobiana, e foram analisados via HPLC. Constatou-se a presença de flavonoides, taninos e fenóis em *M. urundeuva* (Tabela 2).

Tabela 2.

Concentração de metabólitos secundários no extrato etanólico da folha e casca de *M. urundeuva* pela técnica de HPLC.

Metabólitos	Presença
Alcaloide	-
Ácidos orgânicos	++
Fenóis e Taninos	+++
Flavonoides	+++
Esteroides e Triterpenos	++

+++ presença significativa, ++ presença notável, + presença leve, - ausência.

As análises utilizando o espectro de UV (200-800nm) mostrou que as substâncias em maior quantidade são os flavonoides (flavonol e chalconas), fenóis e taninos. Sá et al. (2009), analisaram através da cromatografia de camada delgada os possíveis componentes químicos do extrato etanólico de *M. urundeuva* também observaram a presença de flavonoides e taninos. Os flavonoides e taninos são compostos comuns na natureza, atuando na atração de polinizadores e como co-pigmentos das antocianidinas, apresentam várias atividades biológicas, destacando-se as anti-inflamatórias, antibióticas, antitumorais e antioxidantes (Araújo et al., 2008; Dourado e Ladeira, 2008).

A análise fitoquímica dos extratos etanólicos da casca e folhas de *M. urundeuva* mostrou a presença de flavonoides e taninos e pesquisas têm mostrado que estes compostos possuem atividades biológicas importantes, dentre elas atividade antioxidante e antimicrobiana (Araújo et al., 2008; Jandú et al., 2013; Siqueira et al., 2012).

3.3 Teste em *Allium cepa*

O teste em *A. cepa* tem sido utilizado para estudos de avaliação preliminar da toxicidade, visando à detecção do potencial de genotoxicidade, mutagenicidade e citotoxicidade em extratos vegetais (Eren e Özata, 2014). A toxicidade foi verificada pela inibição da germinação das sementes e do crescimento radicular, a citotoxicidade foi determinada pelo número de células meristemáticas em mitose, e a genotoxicidade e

mutagenicidade foram determinadas através de danos no DNA e alterações nucleares observadas (Fiskesjö, 1994).

Todas as concentrações testadas dos extratos etanólico da casca e folhas de *M. urundeuva*, influenciaram na germinação das sementes e no crescimento das raízes de *A. cepa*, sendo observado um efeito dose resposta, onde o aumento na concentração dos extratos resultou em uma diminuição no número de sementes que germinaram e no tamanho das raízes ($p < 0,05$) (Tabela 3).

Os extratos etanólico da casca e folhas de *M. urundeuva* diminuíram a atividade mitótica das células meristemáticas de *A. cepa*, e estes extratos não apresentaram atividade mutagênica para as células, pois não foram encontrados valores significativos para o IAC e IMt nas concentrações testadas ($p > 0,05$).

Tabela 3.

Índice de germinação (IG) das sementes, Tamanho médio das raízes (TM), Índice Mitótico (IM), Índice de alterações cromossômicas (IAC) e Índice de Mutagenicidade (IMt) em *A. cepa*, após tratamento com diferentes concentrações dos extratos etanólico da folha e casca de *M. urundeuva*.

Extratos	Concentrações (mg mL ⁻¹)	IG (Med/DP)	TM (Med/DP)	IM (Med/DP)	IAC (Med/DP)	IMt (Med/DP)
Folha	CP	0 _a	0 _a	1,12±0,97 _b *	1,8±0,55 _b *	1,98±0,31 _b *
	CN	63±2,52	1,95±0,10	3,53±0,79	0,01±0,02	0,06±0,05
	0,2	48±2,00*	1,16±0,20*	3,34±1,20	0,02±0,01	0,09±0,07
	0,3	40±4,73*	0,80±0,34*	2,87±0,80*	0,02±0,01	0,10±0,05
	0,4	47±1,53*	0,88±0,29*	2,79±1,41*	0,03±0,01	0,10±0,12
	0,5	32±2,52*	0,58±0,23*	1,46±0,69*	0,02±0,02	0,10±0,12
	1,0	17±3,06*	0,24±0,27*	0,83±0,47*	0,01±0,03	0,10±0,10
Casca	CP	0 _a	0 _a	0,91±0,88 _b *	1,8±0,55 _b *	1,68±0,31 _b *
	CN	69±3,61	1,97±0,12	3,00±0,60	0,01±0,02	0,06±0,05
	0,2	42±1,53*	1,09±0,40*	1,78±0,32*	0,01±0,01	0,02±0,05
	0,3	47±3,06*	1,14±0,31*	1,60±0,77*	0,01±0,02	0,04±0,05
	0,4	56±1,53*	0,98±0,21*	1,83±0,49*	0,03±0,01	0,04±0,05
	0,5	57±1,53*	0,91±0,18*	1,79±0,84*	0,01±0,01	0,02±0,04
	1,0	45±2,65*	0,63±0,14*	1,12±0,13*	0,01±0,01	0,02±0,04

Med/DP: Média e Desvio Padrão. As letras a e b na tabela indicam o tipo de controle positivo utilizado. CP_a: Controle Positivo (IG; TM) – formol 3%; CP_b: Controle Positivo (IM; IMt) – Trifluralina (0,84ppm); Controle Negativo (CN) – água destilada. *Mann-Whitney ($p < 0,05$).

Considerando os resultados do índice de germinação, crescimento das raízes e índice mitótico, os extratos apresentaram atividade antiproliferativa, por diminuírem o número de células no tecido vegetal. A diminuição do índice mitótico das células

meristemáticas de *A. cepa* pode ser interpretada como morte celular (Ping et al., 2012). Lacerda et al. (2011), utilizando *Artemia salina* para avaliação citotóxica do extrato etanólico da folha de *M. urundeuva* e de outras plantas, observaram que o extrato apresentou toxicidade elevada, com a concentração letal 50% (LC₅₀) a 39,38mg mL⁻¹. Nossos resultados mostram que a concentração 0,2mg mL⁻¹ apresenta toxicidade, diminuindo a germinação das sementes e o crescimento das raízes de *A. cepa* (p< 0,05).

Diversos compostos presentes nas plantas podem ser responsáveis pela inibição da divisão e morte celular, e conseqüentemente influenciar no crescimento de tecidos vegetais. Compostos alelopáticos podem ser responsáveis por diminuir ou mesmo inibir a germinação das sementes e o crescimento das raízes (Rodrigues et al., 2012). Na família Anacardiaceae, ao qual pertence *M. urundeuva*, diversas espécies são consideradas alelopáticas (Donnelly et al., 2008), este aspecto tem sido considerado por alguns estudos como importante para fins medicinais, devido à atividade antimicrobiana encontrada em substâncias alelopática (Gehrke et al., 2013; Pawlowski et al., 2013). Os compostos alelopáticos são originados do metabolismo secundário das plantas e entre eles encontram-se os flavonoides, taninos, esteroides e terpenóides (Li et al., 2010). As análises fitoquímicas de *M. urundeuva* indicaram a presença de flavonoides, taninos, esteroides e terpenóides, sendo um indicativo que esta espécie apresenta compostos com atividades alelopática.

Apesar de apresentarem atividade citotóxica, os extratos de *M. urundeuva* não apresentaram atividade mutagênica no teste em *A. cepa*. Mesmo não apresentando atividade mutagênica neste teste, *M. urundeuva* não pode ser considerada uma espécie livre de compostos mutagênicos, pois, o teste em *A. cepa* é conduzido em um organismo vegetal.

3.4 Teste de Ames

Todas as linhagens utilizadas no teste de Ames apresentam auxotrofia para histidina (his-), além disso, cada linhagem detecta diferentes mutações causadas pelo mutágeno, a TA97a e TA98 detectam mutações do tipo *frameshift* (deslocamento do quadro de leitura), TA100 detecta substituições de pares de bases e TA102 além de detectar mutações do tipo *frameshift* também possui a mutação hisG428, que aumenta os sítios específicos para mutagênese e detecta vários mutágenos que dificilmente são detectados nas outras cepas (Maron e Ames, 1983). A utilização destas cepas em

conjunto permite verificar a ação dos extratos em diferentes regiões do DNA de cada cepa. O teste de Ames, sem ativação metabólica (-S9) foi desenvolvido para detecção de mutágenos com ação direta. O composto testado é considerado mutagênico quando pelo menos uma das cepas apresenta resposta positiva (formação de colônias), e observado efeito dose resposta, quanto maior a dose maior o número de colônias. O número de colônias revertentes deve ser duas vezes, ou mais, que o número de colônias do controle negativo, para ser considerada uma resposta positiva (Maron e Ames, 1983).

Os resultados deste trabalho mostram que os extratos etanólico da casca e folhas de *M. urundeuva* não exibe atividade mutagênica de ação direta, em todas as concentrações testadas nas quatro cepas de *S. Typhimurium* (TA97a, TA98, TA100 e TA102), uma vez que a razão de mutagenicidade foi inferior a 2 (Tabela 4).

Tabela 4.

Atividade mutagênica avaliada pelo número de colônias e a razão de mutagenicidade induzida pelo extrato etanólico da folha e casca de *M. urundeuva*, nas cepas TA97a, TA98, TA100 e TA102 de *S. Typhimurium*.

Extratos	Tratamento ($\mu\text{g placa}^{-1}$)	TA97a		TA98		TA100		TA102	
		Med/DP	RM	Med/DP	RM	Med/DP	RM	Med/DP	RM
Folha	0,05	121,67 \pm 6,64	1,26	14,67 \pm 2,08	1,05	54,67 \pm 2,58	1,12	214,67 \pm 4,69	1,05
	0,09	100,33 \pm 8,5	1,04	14,67 \pm 3,54	1,05	66,67 \pm 0,71	1,37	329,33 \pm 4,73	1,61
	0,19	97,33 \pm 5,22	1,01	12,67 \pm 2,52	0,90	53,00 \pm 4,36	1,09	285,67 \pm 5,73	1,39
	0,28	118,67 \pm 4,32	1,23	13,00 \pm 4,24	0,93	47,00 \pm 3,9	0,97	255,00 \pm 6,19	1,24
	0,38	103,33 \pm 3,44	1,07	13,67 \pm 2,12	0,98	43,67 \pm 1,41	0,90	273,00 \pm 4,95	1,33
	CN	96,33 \pm 2,44	1	14,00 \pm 1,3	1	48,67 \pm 2,2	1	205,00 \pm 10,45	1
	CP	729,00 \pm 5,5*	7,57	569,33 \pm 8,85*	40,67	512,33 \pm 4,3*	10,53	1143,00 \pm 25,67*	5,58
Casca	0,05	154,67 \pm 6,29	1,61	12,67 \pm 1,15	0,90	69,00 \pm 8,89	1,42	260,00 \pm 2,83	1,27
	0,09	152,67 \pm 2,03	1,58	14,00 \pm 3,36	1,00	60,67 \pm 4,85	1,25	154,67 \pm 6,71	0,75
	0,19	93,33 \pm 9,29	0,97	15,00 \pm 2,65	1,07	59,00 \pm 7,78	1,21	165,67 \pm 4,33	0,81
	0,28	110,00 \pm 8,42	1,14	14,33 \pm 2,12	1,02	65,67 \pm 8,49	1,35	267,67 \pm 9,19	1,31
	0,38	97,67 \pm 8,99	1,01	15,33 \pm 4,24	1,10	78,00 \pm 9,09	1,60	192,67 \pm 3,21	0,94
	CN	96,33 \pm 2,44	1	14,00 \pm 1,3	1	48,67 \pm 2,2	1	205,00 \pm 10,45	1
	CP	729,00 \pm 5,5*	7,57	569,33 \pm 8,85*	40,67	512,33 \pm 4,3*	10,53	1143,00 \pm 25,67*	5,58

Med/DP: Média de colônias revertentes e Desvio Padrão, RM: Razão de mutagenicidade. Controle Negativo: DMSO, 100 $\mu\text{L placa}^{-1}$; Controle Positivo: 4-nitro-o-fenilenodiamina (10 $\mu\text{g placa}^{-1}$) TA98; Azida sódica (1,25 $\mu\text{g placa}^{-1}$) TA100 e TA 97a; e Mitomicina C (0,5 $\mu\text{g placa}^{-1}$) para TA102. * ANOVA $p < 0,05$.

Os compostos que apresentam maior potencial de atividade biológica (atividade antioxidante, antimicrobiana, mutagênica e antimutagênica) nos extratos de plantas são os flavonoides e taninos (Araújo et al., 2008; Resende et al., 2012; Siqueira et al., 2012). Foi identificada a presença de flavonoides e de taninos em *M. urundeuva*, e os

resultados mostram que os extratos etanólico da casca e folhas não apresentam efeitos mutagênicos, no entanto os efeitos biológicos de taninos e flavonoides podem variar.

Resende et al. (2012), avaliando dez tipos de flavonoides, encontraram atividade mutagênica em alguns flavonoides e em outros atividade antimutagênica, sendo que, alguns flavonoides apresentavam ação dupla. O potencial mutagênico de taninos também é controverso, relatos apontam que os taninos podem causar danos ao DNA, enquanto outros estudos mostraram que os taninos podem ter atividade antimutagênica (Silva et al., 2014).

O fato dos extratos não apresentarem mutagenicidade direta é um importante aspecto para o aprofundamento nos estudos destes extratos, mas é importante ressaltar que, a segurança no uso de extratos de *M. urundeuva* não pode ser garantida, uma vez que, os metabólitos gerados pelo consumo destes extratos podem ser mutagênicos.

3.5 Atividade Hemolítica *in vitro*

A avaliação do potencial citotóxico dos extratos em células humanas foi avaliada através da análise da atividade hemolítica. A atividade hemolítica é o resultado da ação dos compostos sobre a permeabilidade da membrana celular, com a formação de poros na membrana (Hu et al., 1996).

Os resultados da avaliação da atividade hemolítica em eritrócitos humanos estão apresentados na Tabela 5, e foram expressos em porcentagem. Os extratos não apresentaram atividade hemolítica superior a 25% nas concentrações testadas, esse resultado indica que os extratos da casca e folha de *M. urundeuva* não foram citotóxicos para os eritrócitos.

Tabela 5.

Atividade hemolítica dos extratos etanólicos da folha (EEF) e casca (EEC) de *M. urundeuva*.

EEF		EEC	
Concentração (mg mL ⁻¹)	Atividade hemolítica (%)	Concentração (mg mL ⁻¹)	Atividade hemolítica (%)
0,05	2	0,05	5
0,1	8	0,1	17
0,5	12	0,5	25
CN	0	CN	0
CP	100	CP	100

Controle Negativo (CN): PBS; Controle Positivo (CP): *Quillaja saponina* (0,0025%).

Carvalho e Oliveira (2012), avaliaram toxicidade do extrato metanólico das folhas de *M. urundeuva* através atividade hemolítica e não observaram atividade do extrato nos eritrócitos. Jandú et al. (2013), avaliando o extrato da casca de *M. urundeuva*, também não encontraram atividade hemolítica. Assim como nesses trabalhos, os nossos resultados mostraram que os extratos etanólicos da casca e folhas de *M. urundeuva*, não causam hemólise nas hemácias.

O teste de avaliação da atividade hemolítica vem sendo utilizado em estudos com extratos de plantas, principalmente em conjunto com testes de avaliação da atividade antimicrobiana (Carvalho e Oliveira, 2012; Jandú et al., 2013). Porém, considerando os resultados obtidos em outros testes neste trabalho, esse teste possui baixa eficiência na identificação de compostos citotóxicos.

Neste sentido, a avaliação citotóxica de extratos vegetais não devem considerar apenas os resultados obtidos com a análise da atividade hemolítica, sendo necessárias outras abordagens, podendo envolver outros testes *in vitro*.

3.6 Toxicidade aguda

A mortalidade das cobaias causada pela ingestão de um composto é um sinal claro de toxicidade *in vivo*. Entretanto, outras variáveis podem ser observadas, dentre elas, a avaliação da perda de massa corporal durante a exposição do composto estudado e a presença de sinais clínicos de toxicidade, como, diarreia, piloereção, variações no comportamento e sangramento (Kapoor et al., 2014).

Após a administração dos extratos etanólico da casca e folhas de *M. urundeuva*, as ratas de ambos os grupos apresentaram letargia, aumento da frequência respiratória e ausência total de movimentos, após 15 minutos as ratas retornaram lentamente os movimentos, mas permaneceram com a frequência respiratória alta. No primeiro dia após a administração dos extratos, duas ratas (uma do grupo do extrato etanólico da folha e uma do grupo do extrato etanólico da casca) apresentaram sangramento nasal e dificuldade na respiração, sendo que no segundo dia estas morreram. Nestes dois animais, sob exame macroscópico, observou-se o abdômen inchado e após a dissecação pode-se constatar que o intestino delgado estava com a coloração amarelada e com formação de bolhas internas. Na avaliação histopatológica do fígado, pulmão e dos rins não foi evidenciada nenhuma alteração histológica desses órgãos.

Ustulin et al. (2009), com base em levantamentos bibliográficos, relataram possível toxicidade em *M. urundeuva*. Almeida et al. (2010), avaliaram a toxicidade de extratos etanólico das folhas de aroeira (*M. urundeuva*), por meio da determinação da dose letal 50% (DL₅₀), utilizando a via intraperitoneal. Demonstraram que a DL₅₀ do extrato etanólico das folhas de *M. urundeuva* foi igual a 0,31mg mL⁻¹, indicando assim toxicidade aguda na via intraperitoneal.

Considerando os resultados e com base na literatura, o extrato etanólico da casca e folhas de *M. urundeuva* apresenta toxicidade aguda, porém, a avaliação histopatológica não encontrou alterações. Desta forma, outros estudos de toxicidade *in vivo* e *in vitro* devem ser realizados para melhor identificação da toxicidade dessa planta.

4. Conclusão

A segurança e eficiência das plantas medicinais é uma das questões centrais quando há o interesse na utilização dos seus compostos. O presente estudo indica que os extratos etanólicos da casca e folhas de *Myracrodruon urundeuva* apresentam atividade contra leveduras do gênero *Candida* e bactérias. A análise química dos extratos confirmou a presença de flavonoides (chalconas e flavonol) e taninos.

Os extratos etanólicos da casca e folhas não apresentaram efeito mutagênico e genotóxico, porém, mostraram efeito citotóxico e tóxico. Os resultados mostraram que testes em vegetais (*Allium cepa*) e animais (ratos *Wistars*) apresentam similaridade entre os resultados de avaliação toxicológica. O teste de Ames (bactérias) e de *A. cepa* (vegetal) também apresentaram similaridade.

Considerando a avaliação citotóxica dos extratos etanólicos da casca e folhas de *M. urundeuva*, o teste de avaliação da atividade hemolítica apresentou baixa atividade não indicando citotoxicidade, no entanto para o teste em *A. cepa* os extratos apresentaram citotoxicidade, e o teste de toxicidade aguda indicou que os extratos apresentam toxicidade.

Ressalta-se que os testes em *A. cepa* e de toxicidade aguda são realizados em organismos, enquanto o teste de atividade hemolítica é realizado *in vitro*, com apenas um tipo celular, os eritrócitos. A ausência da atividade hemolítica em eritrócitos e a presença de citotoxicidade e toxicidade nos outros testes, sugere que a ação tóxica do

extrato etanólico da casca e folhas de *M. urundeuva* não está relacionada ao dano de membrana, podendo essa atividade estar relacionada a outros mecanismos de ação.

Os resultados indicam ausência de efeito mutagênico e genotóxico, no entanto foi observada a existência de efeitos tóxicos dos extratos de *M. urundeuva*, este fato sugere maior cautela na utilização dos extratos. Para garantir maior segurança no uso dos extratos, recomenda-se a realização do teste de Ames com sistema de metabolização exógeno (+S9), bem como outros testes toxicológicos *in vivo* e *in vitro*, como o teste de citotoxicidade em culturas celular e de mutagênese em ratos.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (FUNDECT) pelo apoio financeiro e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo financiamento de uma bolsa de estudos de pós-graduação.

Referências

- Almeida, A.C., Sobrinho, E.M., Pinho, L. De, Martins, E.R., Duarte, E.R., Brandi, I.V., Cangussu, A.S., 2010. Toxicidade aguda dos extratos hidroalcoólicos das folhas de alecrim-pimenta, aroeira e barbatimão e do farelo da casca de pequi administrados por via intraperitoneal. *Ciência Rural* 40, 1, 200-3.
- Araújo, T.A.S., Alencar, N.L., Amorim, E.L.C., Albuquerque, U.P., 2008. A new approach to study medicinal plants with tannins and flavonoids contents from the local knowledge. *Journal of Ethnopharmacology* 120, 72–80. doi:10.1016/j.jep.2008.07.032
- Bagiu, R.V., Vlaicu, B., Butnariu, M., 2012. Chemical composition and *in vitro* antifungal activity screening of the *Allium ursinum* L. (Liliaceae). *International Journal of Molecular Sciences* 13, 1426–1436. doi: 10.3390/ijms13021426
- Brasil., 2013. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Consolidado de normas da COFID. Versão IV. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/6805ba804f5ea576920df79a71dcc661/ConsolidadoVersaoIVpublicar.pdf?MOD=AJPERES>> Acesso em: 08.04.15.
- Carvalho, M.S., Oliveira, D.A., 2012. Estudo da atividade citotóxica de *Myracrodruon urundeuva* FR. Allemão. *Revista Eletrônica de Biologia* 5, 1-7.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)., 2008. M27-A3 reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard, third edition. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne.

- Cunha, F.P.; Costa, L.J.L.; Fernandes, A.J.D.; Souza, T.P.; Soares, L.A.L., 2009. Development and optimization of extractives from *Astronium urundeuva* (Allemão) Engl. by factorial design. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 52, 647-652.
- Donnelly, M.J., Green, D.M., Walters, L.J., 2008. Allelopathic effects of fruits of the Brazilian pepper *Schinus terebinthifolius* on growth, leaf production and biomass of seedlings of the red mangrove *Rhizophora mangle* and the black mangrove *Avicennia germinans*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 357, 149–156. doi:10.1016/j.jembe.2008.01.009
- Dourado, R. S., Ladeira, A. M., 2008. Identification of flavonoids in *Hypericum cordatum* (Vell.) N. Robson (Clusiaceae). *Brazilian Journal of Botany* 31, 611-620.
- Eren, Y., Özata, A., 2014. Determination of mutagenic and cytotoxic effects of *Limonium globuliferum* aqueous extracts by *Allium*, Ames, and MTT tests. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 24, 51–59. doi:10.1590/0102-695X20142413322
- Fernandes, T.C.C.; Mazzeo, D.E.C.; Marin-Morales, M.A., 2007. Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 88, 252-259. doi:10.1016/j.pestbp.2006.12.003
- Fiskesjö, G., 1994. *Allium* Test II: Assesmente of chemical's genotoxic potential by recording aberrations in chromosomes and cell divisions in root tips of *Allium cepa* L. *Environmental Toxicology and Water Quality* 9, 235-241.
- Food and Drug Administration (FDA)., 2012. Guidance on genotoxicity testing and data interpretation for pharmaceuticals intended for human use S2 (R1). In: International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. ICH Expert Working Group, 31. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/default.htm>>. Acesso em: 18.02.15.
- Gehrke, I.T.S., Neto, A.T., Pedroso, M., Mostardeiro, C.P., Da Cruz, I.B.M., Silva, U.F., Ilha, V., Dalcol, I.I., Morel, A.F., 2013. Antimicrobial activity of *Schinus lentiscifolius* (Anacardiaceae). *Journal of Ethnopharmacology* 148, 486–491. doi:10.1016/j.jep.2013.04.043
- Holetz, F.B., Pessini, G.L., Sanches, N.R., Cortez, A.G., Nakamura, C.V., Prado, B., Filho, D., 2002. Screening of some plants used in the brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 97, 1027–1031.
- Hu, M., Konoki, K., Tachibana, K., 1996. Cholesterol-independent membrane disruption caused by triterpenoid saponins. *Biochimica et Biophysica Acta* 1299, 252–258. doi: 10.1016/0005-2760(95)00214-6

- International Organization of Standardization (ISO)., 2014. ISO 10993-3: 2014: Biological evaluation of medical devices— Part 3: Tests for genotoxicity, carcinogenicity, and reproductive toxicity. Arlington: Association for the Advancement of Medical Instrumentation, 30p.
- Jandú, J.J.B., Cláudio, L., Caetano, A.D.P., Souza, R.M. D., Alberto, C., Bressan, R.C., Figueiredo, Q. D., Araújo, J.M. D., Tereza, M., Vanusa, M., 2013. *Myracrodruon urundeuva* bark : an antimicrobial, antioxidant and non-cytotoxic agent. Journal of Medicinal Plants Research 7, 413–418. doi:10.5897/JMPR12.681
- Kapoor, U., Srivastava, M.K., Trivedi, P., Garg, V., Srivastava, L.P., 2014. Disposition and acute toxicity of imidacloprid in female rats after single exposure. Food and Chemical Toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association 68, 190–5. doi:10.1016/j.fct.2014.03.019
- Khalil, A.H., El-Adawy, T.A., 1994. Isolation, identification and toxicity of saponin from different legumes. Food Chemistry 50, 197–201. doi: 10.1016/0308-8146(94)90120-1
- Lacerda, A.M., Modolo, A.K., Matias, R.C., Pistori, H., Yano, M., Roel, A.R., Porto, K.R.A., 2011. Screening de plantas com potencial fitotóxico. Revista Brasileira de Farmácia 92, 352–355.
- Leme, D.M., Marin-Morales, M.A., 2009. *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. Mutation Research - Reviews in Mutation Research 682, 71–81. doi: 10.1016/j.mrrev.2009.06.002
- Li, Z.-H., Wang, Q., Ruan, X., Pan, C.-D., Jiang, D.-A., 2010. Phenolics and plant allelopathy. Molecules 15, 8933–52. doi:10.3390/molecules15128933
- Lorenzi, H., Matos, F.J.A., 2008. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. Plantarum, 2.ed. Nova Odessa.
- Maron, D.M., Ames, B.N., 1983. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. Mutation Research 113, 173–215. doi: 10.1016/0165-1161(83)90010-9
- Mortelmans, K., Zeiger, E., 2000. The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis 455, 29–60. doi: 10.1016/S0027-5107(00)00064-6
- Oliveira Júnior, S.R.; Conceição, G.M. , 2010. Espécies vegetais nativas do Cerrado utilizadas como medicinais pela comunidade Brejinho, Caxias, Maranhão, Brasil. Cadernos de Geociências 7.
- Organization for Economic Cooperation and Development (OECD)., 2001. Guidelines for the testing of chemicals: Acute Oral Toxicity – Fixed Dose Procedure. OECD, Guideline 420, Paris. Disponível em: <http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-420-acute-oral-toxicity-fixed-dose-procedure_9789264070943-en>. Acesso em: 20.01.15.

- Paz, M.F.C.J., Alencar, M.V.O.B., Soares, R.L.L., Costa, D.D.A.F., Nunes, A.T., Cavalcante, A.A.D.C.M., 2013. Avaliação tóxica, citotóxica, mutagênica e genotóxica do látex da *Himatanthus succuuba*: uma questão de saúde pública. *Revista Interdisciplinar* 6, 52–61.
- Pawlowski, Â., Kaltchuk-Santos, E., Brasil, M.C., Caramão, E.B., Zini, C. A., Soares, G.L.G., 2013. Chemical composition of *Schinus lentiscifolius* March. essential oil and its phytotoxic and cytotoxic effects on lettuce and onion. *South African Journal of Botany* 88, 198–203. doi:10.1016/j.sajb.2013.07.026
- Ping, K.Y., Darah, I., Yusuf, U.K., Yeng, C., Sasidharan, S., 2012. Genotoxicity of *Euphorbia hirta*: an *Allium cepa* assay. *Molecules* 17, 7782–7791. doi:10.3390/molecules17077782
- Resende, F.A., Vilegas, W., Dos Santos, L.C., Varanda, E.A., 2012. Mutagenicity of flavonoids assayed by bacterial reverse mutation (Ames) test. *Molecules* 17, 5255–5268. doi: 10.3390/molecules17055255
- Rodrigues, A.C., Artioli, F.A., Polo, M., Barbosa, L.C.A., Beijo, L.A., 2012. Efeito alelopático de folhas de bamburral [*Hyptis suaveolens* (L .) Poit .] sobre a germinação de sementes de sorgo (*Sorghum vulgare* Pers .), rabanete (*Raphanus sativus* L .) e alface (*Lactuca sativa* L .) *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais* 14, 487–493.
- Sá, R.A., Argolo, A.C.C., Napoleão, T.H., Gomes, F.S., Santos, N.D.L., Melo, C.M.L., Albuquerque, A.C., Xavier, H.S., Coelho, L.C.B.B., Bieber, L.W., Paiva, P.M.G., 2009. Antioxidant, Fusarium growth inhibition and *Nasutitermes corniger* repellent activities of secondary metabolites from *Myracrodruon urundeuva* heartwood. *International Biodeterioration & Biodegradation* 63, 470–477. doi:10.1016/j.ibiod.2009.01.002
- Silva, C.A., Silva, C.R., Vêras, J.H., Chen-Chen, L., Ferri, P.H., Santos, S.D.C., 2014. Genotoxicity and cytotoxicity evaluation of oenothien B and its protective effect against mitomycin C-induced mutagenic action. *Mutation research. Genetic toxicology and environmental mutagenesis* 767, 8–12. doi:10.1016/j.mrgentox.2014.04.003
- Siqueira, C.F.D.Q., Cabral, D.L.V., Peixoto Sobrinho, T.J.D.S., Amorim, E.L.C., Melo, J.G., Araújo, T.A.D.S., Albuquerque, U.P., 2012. Levels of tannins and flavonoids in medicinal plants: evaluating bioprospecting strategies. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine* 2012, 7. doi: 10.1155/2012/434782
- Ustulin, M., Figueiredo, B.D.B., Tremea, C., Pott, A., Pott, V.J., Bueno, N.R., Castilho, R.O., 2009. Revisão plantas medicinais comercializadas no Mercado Municipal de Campo Grande-MS. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 19, 805–813. doi: 10.1590/S0102-695X2003000200004
- Valadares, M.C., 2006. Avaliação da toxicidade aguda: estratégias após a “era do teste DL50”. *Revista Eletrônica de Farmácia* 3, 93–98.

- Varanda, E. A. Atividade mutagênica de plantas medicinais., 2009. Revista de Ciências Farmacêuticas básica e aplicada 27, 1–7.
- Yan, Z., Hua, H., Xu, Y., Samaranayake, L.P., 2012. Potent antifungal activity of pure compounds from traditional chinese medicine extracts against six oral *Candida* species and the synergy with fluconazole against azole-resistant *Candida albicans*. Evidence-based Complementary and Alternative Medicine eCAM 2012, 106583. doi:10.1155/2012/106583
- World Health Organization (WHO)., 2005. Operational guidance: Information needed to support clinical trials of herbal products. TDR/GEN/Guidance/05.1, Geneva. Disponível em: <[http:// www.who.int/tdr/publications/documents/operational-guidance-eng.pdf](http://www.who.int/tdr/publications/documents/operational-guidance-eng.pdf)>. Acesso em: 01.04.15.

5. CONCLUSÃO GERAL

O presente estudo indica que o extrato etanólico da casca e folha de *Myracrodruon urundeuva* apresenta atividade antimicrobiana. A análise química dos extratos confirmaram a presença de fenóis, taninos e flavonoides do tipo chalconas e flavonol, e que possivelmente estes compostos estão relacionados à atividade antimicrobiana. Os extratos etanólico da casca e folha não apresentaram efeito mutagênico e genotóxico nos teste em *Allium cepa* e no teste de Ames. Porém, os extratos mostraram efeito citotóxico e tóxico sobre células, raízes e sementes de *A. cepa* e toxicidade aguda em ratos *Wistars*.

Com base nos resultados, o uso dos extratos de *M. urundeuva* deve ser realizado com cuidado, pois os testes indicaram que os extratos desta planta apresentam toxicidade. Outros estudos devem ser realizados para garantir a segurança na utilização dos compostos originados da mesma.

ANEXOS

Anexo I



Figura 2. Coleta do material vegetal, folhas (esquerda) e casca (direita) de *Myracrodruon urundeuva*. Fonte: Oliveira, 2013.



Figura 3. Exatção líquido-líquido. Fonte: Oliveira, 2014.



Figura 4. Microplaca com diferentes concentrações do extrato hidroalcoólico da casca de *M. urundeuva* para avaliação da CIM em bactérias. Fonte: Oliveira, 2014.

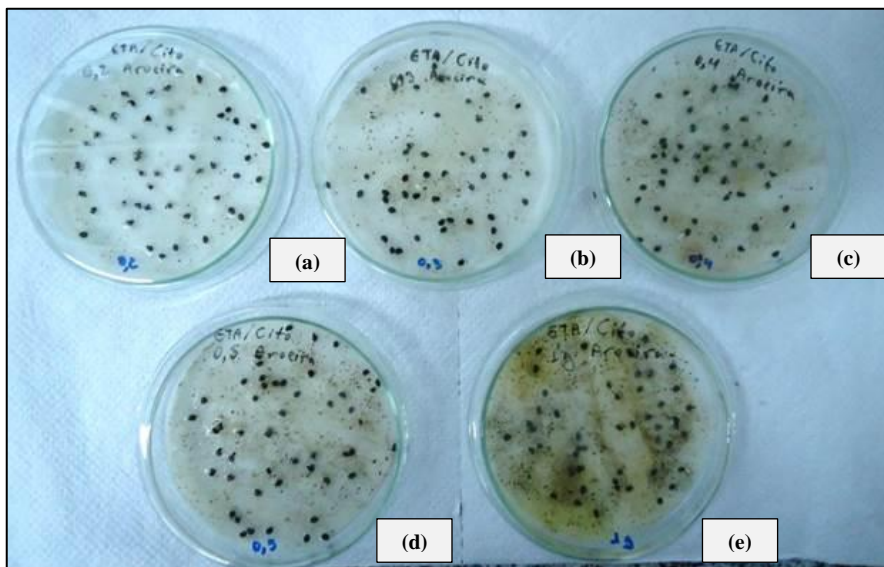


Figura 5. Placas com sementes de *Allium cepa* em diferentes concentrações do extrato etanólico da folha de *M. urundeuva* (a= 0,2; b= 0,3; c= 0,4; d= 0,5 e; e= 1mg mL⁻¹). Fonte: Oliveira, 2014.

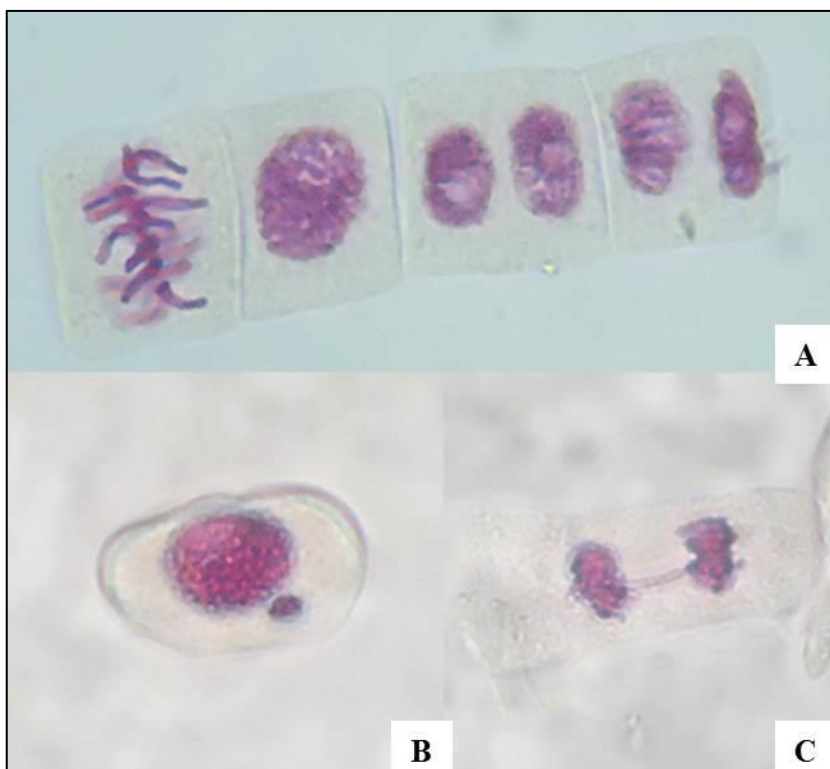


Figura 6. Células meristemáticas de *Allium cepa*, indicando os diferentes estágios de divisão celular (A – da esquerda para direita metáfase, prófase e telófase), célula com micronúcleo (B) e telófase com ponte cromossômica (C). Fonte: Oliveira, 2014.

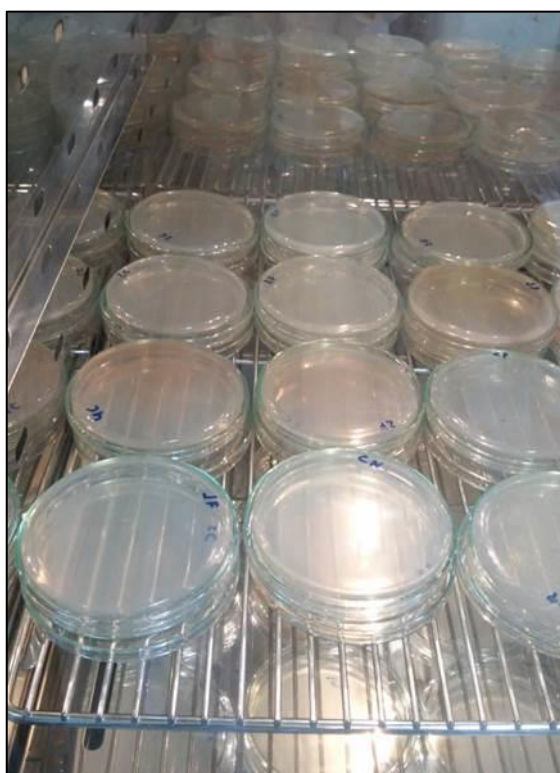


Figura 7. Placas em cultivo para o teste de Ames do extrato etanólico da casca de *M. urundeuva*. Fonte: Oliveira, 2015.

Anexo II

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O objetivo deste estudo é de realizar a avaliação toxicológica de extratos de *Myracrodruon urundeuva*. A pesquisa faz parte de uma dissertação de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Federal da Grande Dourados – UFGD, orientada pela Prof. Dra. Kelly Mari Pires de Oliveira. As análises serão realizadas no Laboratório de Microbiologia Aplicada, Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais.

Neste sentido, declaro para devidos fins, concordância em fornecer um volume de 10mL de sangue que serão utilizados para avaliação da atividade hemolítica de extratos de *Myracrodruon urundeuva*.

De acordo

Nome

Assinatura

Data...../...../.....

Anexo III

JOURNAL OF ETHNOPHARMACOLOGY

ISSN: 0378-8741

An Interdisciplinary Journal Devoted to Indigenous Drugs

AUTHOR INFORMATION PACK

TABLE OF CONTENTS

- **Description**
- **Audience**
- **Impact Factor**
- **Abstracting and Indexing**
- **Editorial Board**
- **Guide for Authors**

DESCRIPTION

The *Journal of Ethnopharmacology* is dedicated to the exchange of information and understandings about people's use of plants, fungi, animals, microorganisms and minerals and their **biological** and **pharmacological effects** based on the principles established through international conventions.

Early people confronted with illness and disease, discovered a wealth of useful **therapeutic agents** in the plant and animal kingdoms. The empirical knowledge of these **medicinal substances** and their toxic potential was passed on by oral tradition and sometimes recorded in herbals and other texts on *materia medica*. Many valuable drugs of today (e.g., atropine, ephedrine, tubocurarine, digoxin, reserpine) came into use through the study of **indigenous remedies**. Chemists continue to use **plant-derived drugs** (e.g., morphine, taxol, physostigmine, quinidine, emetine) as prototypes in their attempts to develop more effective and less toxic medicinals.

In recent years the preservation of local knowledge, the promotion of indigenous medical systems in primary health care, and the conservation of biodiversity have become even more of a concern to all scientists working at the interface of social and natural sciences but especially to ethnopharmacologists. Recognizing the sovereign rights of States over their natural resources, ethnopharmacologists are particularly concerned with local people's rights to further use and develop their autochthonous resources.

Accordingly, today's ethnopharmacological research embraces the multidisciplinary effort in the:

- documentation of **indigenous medical knowledge**,
- scientific study of **indigenous medicines** in order to contribute in the long-run to improved health care in the regions of study, as well as
- search for pharmacologically unique principles from existing indigenous remedies.

The *Journal of Ethnopharmacology* publishes original articles concerned with the observation and experimental investigation of the biological activities of plant and animal substances used in the traditional medicine of past and present cultures. The journal will particularly welcome interdisciplinary papers with an **ethnopharmacological**, an **ethnobotanical** or an **ethnochemical** approach to the study of indigenous drugs. Reports of **anthropological** and **ethnobotanical** field studies fall

within the journal's scope. Studies involving **pharmacological** and **toxicological** mechanisms of action are especially welcome. Clinical studies on efficacy will be considered if contributing to the understanding of specific ethnopharmacological problems. The journal welcomes review articles in the above mentioned fields especially those highlighting the multi-disciplinary nature of ethnopharmacology. Commentaries are by invitation only.

AUDIENCE

Ethnopharmacologists, Medicinal Chemists, Pharmacologists, Toxicologists, Anthropologists, Pharmacognosists, Ethnobotanists, Economic Botanists, Ethnobiologists

IMPACT FACTOR

2013: 2.939 © Thomson Reuters Journal Citation Reports 2014

ABSTRACTING AND INDEXING

AGRICOLA
BIOSIS
Cambridge Scientific Abstracts
Chemical Abstracts
Current Contents/Life Sciences
MEDLINE®
International Pharmaceutical Abstracts
EMBASE
NAPRALERT (Natural Products Alert)
Science Citation Index
CAB Abstracts
Scopus
EMBiology

EDITORIAL BOARD

Editor-in-Chief:

R. Verpoorte, Gorlaeus Lab., HB024, Universiteit Leiden, Einsteinweg 55, 2333 CC, Leiden, Netherlands

Deputy Editor-in-Chief

A.M. Viljoen, Tshwane University of Technology, Pretoria, South Africa

Associate Editor:

D. Guo, Chinese Academy of Sciences (CAS), Shanghai, China

A.K. Jäger, University of Copenhagen, Copenhagen O, Denmark

G. Lin, Chinese University of Hong Kong, Hong Kong, Hong Kong

P.K. Mukherjee, Jadavpur University, Kolkata, India

G. Schmeda Hirschmann, Universidad de Talca, Talca, Chile

A. Shikov, Saint Petersburg Institute of Pharmacy, Kuzmolovo P 245, Russian Federation

E. Yesilada, Yeditepe University, Erenkoy-Istanbul, Turkey

Reviews Editor (including Commentaries and Book Reviews):

M. Heinrich, The School of Pharmacy, University of London, 29-39 Brunswick Square, London, WC1N 1AX, UK

If you want to suggest a review, please provide a structured abstract and include an annotated table of contents and a short CV of the lead author(s).

Managing Editor:

B. Pomahacova, Leiden University, Leiden, Netherlands

I. Vermaak, Tshwane University of Technology, Pretoria, South Africa

M. Sandasi, Tshwane University of Technology, Pretoria, South Africa

Editorial Board:

S. Alban, Kiel, Germany

M.J. Balick, Bronx, New York, USA

R. Bauer

G. Bourdy, Cayenne, French Guiana

J.B. Calixto, Florianópolis, Brazil

C-T. Che, Hong Kong, Hong Kong

G.A. Cordell, Evanston, Illinois, USA

V.S. da Silva Bolzani, Araraquara, Brazil

J. Ding, Shanghai, China

V.M. Dirsch, Vienna, Austria

T. Efferth, Heidelberg, Germany

E. Elisabetsky, Porto Alegre, Brazil

J. Fleurentin, Metz, France

B.L. Furman, Glasgow, UK

M.P. Germano, Messina, Italy

J. Gertsch, Bern, Switzerland

A.H. Gilani, Karachi, Pakistan

M.P. Gupta, Panama City, Panama

A. Hensel, Münster, Germany

P.J. Houghton, London, UK

Z. Ismail, Penang, Malaysia

W. Jia, Kannapolis, North Carolina, USA

T. Johns, Ste. Anne de Bellevue, Quebec, Canada

A.K. Jäger, Copenhagen O, Denmark

G. Kavalali, Istanbul, Turkey

H-S. Kim, Cheongju, South Korea

J. Kim, Seoul, South Korea

Y. Kimura, Ehime, Japan

M.A. Lacaille-Dubois, Dijon, France

M. Leonti, Cagliari, Italy

E. Matteucci, Pisa, Italy

I. Merfort, Freiburg, Germany

J.J.M. Meyer, Pretoria, South Africa

D.E. Moerman

D.A. Mulholland, Guildford, England, UK

A. Panthong, Chiang Mai, Thailand

X. Peigen, Beijing, China

A. Pieroni, Pollenzo/Bra, Italy

D.D. Soejarto, Chicago, Illinois, USA

E. Speroni, Bologna, Italy
A.J. Vlietinck, Antwerpen, Belgium
H. Wagner, München, Germany
C.S. Weckerle, Zurich, Switzerland
C.W. Wright, Bradford, UK
S. Zacchino, Rosario, Argentina
Founding Editors:
J.G. Bruhn
L. Rivier, Lausanne, Switzerland

GUIDE FOR AUTHORS

INTRODUCTION

The *Journal of Ethnopharmacology* is dedicated to the exchange of information and understandings about people's use of plants, fungi, animals, microorganisms and minerals and their biological and pharmacological effects based on the principles established through international conventions. Early people, confronted with illness and disease, discovered a wealth of useful therapeutic agents in the plant and animal kingdoms. The empirical knowledge of these medicinal substances and their toxic potential was passed on by oral tradition and sometimes recorded in herbals and other texts on *materia medica*. Many valuable drugs of today (e.g., atropine, ephedrine, tubocurarine, digoxin, reserpine) came into use through the study of indigenous remedies. Chemists continue to use plant-derived drugs (e.g., morphine, taxol, physostigmine, quinidine, emetine) as prototypes in their attempts to develop more effective and less toxic medicinals. **Please note that figures and tables should be embedded in the text as close as possible to where they are initially cited.** It is also mandatory to upload separate graphic and table files as these will be required if your manuscript is accepted for publication.

Classification of your paper

Please note that upon submitting your article you will have to select **at least one classification** and **at least three of the given keywords**. You can preview the list of classifications and keywords (here). This information is needed by the Editors to more quickly process your article. In addition to this, you can submit free keywords as described below under "Keywords".

The "rules of 5"

The Editors and Editorial Board have developed the "Rules of 5" for publishing in JEP. We have produced five clear criteria that each author needs to think about before submitting a manuscript and setting the whole process of editing and reviewing at work. For more details on how to write a world class paper, please visit our Pharmacology Author Resources page.

Authors are encouraged to submit video material or animation sequences to support and enhance your scientific research. For more information please see the paragraph on video data below.

Types of paper

The *Journal of Ethnopharmacology* will accept the following contributions:

1. Original research articles - whose length is not limited and should include Title, Abstract, Methods and Materials, Results, Discussion, Conclusions, Acknowledgements and References. As a guideline, a full length paper normally occupies no more than 10 printed pages of the journal, including tables and illustrations.

2. Ethnopharmacological communications (formerly Short Communications) - whose average length is not more than 4 pages in print (approx. 2000-2300 words, including abstract and references). A maximum of 2 illustrations (figures or tables) is allowed. See paragraph below for description and format.

3. Letters to the Editors.

4. Reviews - Authors intending to write review articles should consult and send an outline to the Reviews Editor (see inside front cover for contact information) before preparing their manuscripts.

The organization and subdivision of review articles can be arranged at the author's discretion. Authors should keep in mind that a good review sets the trend and direction of future research on the subject matter being reviewed. Tables, figures and references are to be arranged in the same way as research articles in the journal. Reviews on topics that address cutting-edge problems are particularly welcome.

Outlines for potential reviews need to include: A detailed abstract using the structure provided in the guidelines An annotated table of contents A short CV of the lead author

5. Book reviews - Books for

review should be sent to the Reviews Editor.

6. Commentaries - *invited*, peer-reviewed, critical discussion about crucial aspects of the field but most importantly methodological and conceptual-theoretical developments in the field and should also provide a standard, for example, for pharmacological methods to be used in papers in the

Journal of Ethnopharmacology. The scientific dialogue differs greatly in the social / cultural and natural sciences, the discussions about the common foundations of the field are ongoing and the papers published should contribute to a transdisciplinary and multidisciplinary discussion. The length should be a maximum of 2-3 printed pages or 2500 words. Please contact the Reviews Editor j.ethnopharmacol@pharmacy.ac.uk with an outline.

7. Conference announcements and news.

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/journal-authors/ethics>.

Policy and ethics

In the covering letter, the author must also declare that the study was performed according to the international, national and institutional rules considering animal experiments, clinical studies and biodiversity rights. See below for further information. The ethnopharmacological importance of the study must also be explained in the cover letter.

Animal and clinical studies - Investigations using experimental animals must state in the Methods section that the research was conducted in accordance with the internationally accepted principles for laboratory animal use and care as found in for example the European Community guidelines (EEC Directive of 1986; 86/609/EEC) or the US guidelines (NIH publication #85-23, revised in 1985).

Investigations with human subjects must state in the Methods section that the research followed guidelines of the Declaration of Helsinki and Tokyo for humans, and was approved by the institutional human experimentation committee or equivalent, and that informed consent was obtained. The Editors will reject papers if there is any doubt about the suitability of the animal or human procedures used.

Biodiversity rights - Each country has its own rights on its biodiversity. Consequently for studying plants one needs to follow the international, national and institutional rules concerning the biodiversity rights.

Author contributions

For each author the contribution to the publication should be mentioned.

Conflict of interest

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. See also <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>. Further information and an example of a Conflict of

Interest form can be found at: http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/286/p/7923.

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see <http://www.elsevier.com/sharingpolicy>), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service CrossCheck <http://www.elsevier.com/editors/plagdetect>.

Changes to authorship

This policy concerns the addition, deletion, or rearrangement of author names in the authorship of accepted manuscripts:

Before the accepted manuscript is published in an online issue: Requests to add or remove an author, or to rearrange the author names, must be sent to the Journal Manager from the corresponding author of the accepted manuscript and must include: (a) the reason the name should be added or removed, or the author names rearranged and (b) written confirmation (e-mail, fax, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Requests that are not sent by the corresponding author will be forwarded by the Journal Manager to the corresponding author, who must follow the procedure as described above. Note that: (1) Journal Managers will inform the Journal Editors of any such requests and (2) publication of the accepted manuscript in an online issue is suspended until authorship has been agreed.

After the accepted manuscript is published in an online issue: Any requests to add, delete, or rearrange author names in an article published in an online issue will follow the same policies as noted above and result in a corrigendum.

Article transfer service

This journal is part of our Article Transfer Service. This means that if the Editor feels your article is more suitable in one of our other participating journals, then you may be asked to consider transferring the article to one of those. If you agree, your article will be transferred automatically on your behalf with no need to reformat. Please note that your article will be reviewed again by the new journal. More information about this can be found here: <http://www.elsevier.com/authors/article-transfer-service>.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright, see <http://www.elsevier.com/copyright>). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>.

For open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' (for more information see <http://www.elsevier.com/OAauthoragreement>).

Permitted third party reuse of open access articles is determined by the author's choice of user license (see <http://www.elsevier.com/openaccesslicenses>).

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. For more information see <http://www.elsevier.com/copyright>.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established a number of agreements with funding bodies which allow authors to comply with their funder's open access policies. Some authors may also be reimbursed for associated publication fees. To learn more about existing agreements please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

Open access

This journal offers authors a choice in publishing their research:

Open access

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse
- An open access publication fee is payable by authors or on their behalf e.g. by their research funder or institution

Subscription

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our universal access programs (<http://www.elsevier.com/access>).
- No open access publication fee payable by authors.

Regardless of how you choose to publish your article, the journal will apply the same peer review criteria and acceptance standards.

For open access articles, permitted third party (re)use is defined by the following Creative Commons user licenses:

Creative Commons Attribution (CC BY)

Lets others distribute and copy the article, create extracts, abstracts, and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), include in a collective work (such as an anthology), text or data mine the article, even for commercial purposes, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, and do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation.

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND)

For non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

The open access publication fee for this journal is **USD 3000**, excluding taxes. Learn more about

Elsevier's pricing policy: <http://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/languageediting/>) or visit our customer support site (<http://support.elsevier.com>) for more information.

Submission

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

Additional information

Authors who want to submit a manuscript should consult and peruse carefully recent issues of the journal for format and style. Authors must include the following contact details on the title page of their submitted manuscript: full postal address; fax; e-mail. All manuscripts submitted are subject to peer review. The minimum requirements for a manuscript to qualify for peer review are that it has been prepared by strictly following the format and style of the journal as mentioned, that it is written in good English, and that it is complete. Manuscripts that have not fulfilled these requirements will be returned to the author(s).

In addition, you are recommended to adhere to the research standards described in the following articles:

Cos P., Vlietinck A.J., Berghe D.V., et al. (2006) Anti-infective potential of natural products: how to develop a stronger in vitro 'proof-of-concept'. *Journal of Ethnopharmacology*, 106: 290-302.

Matteucci, E., Giampietro, O. (2008) Proposal open for discussion: defining agreed diagnostic procedures in experimental diabetes research. *Journal of Ethnopharmacology*, 115: 163-172.

Froede, T.S.A. and Y.S. Medeiros, Y.S. (2008) Animal models to test drugs with potential antidiabetic activity. *Journal of Ethnopharmacology* 115: 173-183. Gertsch J.

(2009) How scientific is the science in ethnopharmacology? Historical perspectives and epistemological problems. *Journal of Ethnopharmacology*, 122: 177-183.

Chan K., et al. (2012) Good practice in reviewing and publishing studies on herbal medicine, with special emphasis on traditional Chinese medicine and Chinese Materia Medica. *Journal of Ethnopharmacology* 140: 469-475.

Heinrich, M., Edwards. S., Moerman. D.E.. and Leonti. M. (2009), Ethnopharmacological field studies: a critical assessment of their conceptual basis and methods. *J. Ethnopharmacol*, 124: 1-17.

PREPARATION

Reference formatting

References in the manuscript should be given with the name of the first author (in case of 2 authors, both names, and in case of more first author et al.), and the year of publication, in the reference list any style or format can be used as long as the style is consistent. In the list all author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples:

Use of word processing software

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns.

The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork. To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Theory/calculation

A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Glossary

Please supply, as a separate list, the definitions of field-specific terms used in your article.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix,

Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.

- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lowercase superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address.

Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.

- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**

- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

The author should divide the abstract with the **headings** *Ethnopharmacological relevance, Aim of the study, Materials and Methods, Results, and Conclusions.*

Graphical abstract

A Graphical abstract is mandatory for this journal. It should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership online. Authors must provide images that clearly represent the work

described in the article. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. See <http://www.elsevier.com/graphicalabstracts> for examples. Authors can make use of Elsevier's Illustration and Enhancement service to ensure the best presentation of their images also in accordance with all technical requirements: Illustration Service.

Keywords

After having selected a classification in the submission system, authors must in the same step select 5 keywords. These keywords will help the Editors to categorize your article accurately and process it more quickly. A list of the classifications and set keywords can be found here.

In addition, you can provide a maximum of 6 specific keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, "and", "of"). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Chemical compounds

You can enrich your article by providing a list of chemical compounds studied in the article. The list of compounds will be used to extract relevant information from the NCBI PubChem Compound database and display it next to the online version of the article on ScienceDirect. You can include up to 10 names of chemical compounds in the article. For each compound, please provide the PubChem CID of the most relevant record as in the following example: Glutamic acid (PubChem CID:611). The PubChem CIDs can be found via <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pccompound>. Please position the list of compounds immediately below the 'Keywords' section. It is strongly recommended to follow the exact text formatting as in the example below:

Chemical compounds studied in this article

Ethylene glycol (PubChem CID: 174); Plitidepsin (PubChem CID: 44152164); Benzalkonium chloride (PubChem CID: 15865)

More information is available at: <http://www.elsevier.com/PubChem>.

Plant names

In the Materials and Methods section there must be a separate heading for describing the material used. That includes official name, local name, English name (if known), GPS position in case of collection in the wild or cultivation, a voucher specimen must be deposited in an official herbarium for possible future comparison. In the text it should be stated that the plant name has been checked with www.theplantlist.org mentioning the data of accessing that website.

In case of commercially procured material should mention the source, batch number, quality control data. Data on chemical characterization (metabolomics, chromatographic methods) should also be presented, in case of known active compounds their quantitative analysis should be presented.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Database linking

Elsevier encourages authors to connect articles with external databases, giving their readers one-click access to relevant databases that help to build a better understanding of the described research.

Please refer to relevant database identifiers using the following format in your article: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN). See <http://www.elsevier.com/databaselinking> for more information and a full list of supported databases.

Math formulae

Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple formulae in line with normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors can build footnotes into the text, and this feature may be used. Otherwise, please indicate the position of footnotes in the text and list the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Please note that figures and tables should be embedded in the text as close as possible to where they are initially cited. It is also mandatory to upload separate graphic and table files as these will be required if your manuscript is accepted for publication.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or

MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or online only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Please note: Because of technical complications that can arise by converting color figures to 'gray scale' (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with "Unpublished results".

"*Personal communication*" will not be accepted as a reference. Citation of a reference as "in press" implies that the item has been accepted for publication.

Reference links

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing

services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is encouraged.

Reference management software

Most Elsevier journals have a standard template available in key reference management packages. This covers packages using the Citation Style Language, such as Mendeley (<http://www.mendeley.com/features/reference-manager>) and also others like EndNote (<http://www.endnote.com/support/enstyles.asp>) and Reference Manager (<http://refman.com/support/rmstyles.asp>). Using plug-ins to word processing packages which are available from the above sites, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article and the list of references and citations to these will be formatted according to the journal style as described in this Guide. The process of including templates in these packages is constantly ongoing. If the journal you are looking for does not have a template available yet, please see the list of sample references and citations provided in this Guide to help you format these according to the journal style.

If you manage your research with Mendeley Desktop, you can easily install the reference style for this journal by clicking the link below: <http://open.mendeley.com/use-citation-style/journal-of-ethnopharmacology>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plugins for Microsoft Word or LibreOffice. For more information about the Citation Style Language, visit <http://citationstyles.org>.

Reference style

Text: All citations in the text should refer to:

1. *Single author:* the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. *Two authors:* both authors' names and the year of publication;
3. *Three or more authors:* first author's name followed by 'et al.' and the year of publication.

Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically.

Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999). Kramer et al. (2010) have recently shown'

List: References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 2000. *The Elements of Style*, fourth ed. Longman, New York.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 2009. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304.

Video data

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>.

Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

AudioSlides

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. More information and examples are available at <http://www.elsevier.com/audioslides>. Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

Supplementary material

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research.

Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, highresolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Submission checklist

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded, and contain:

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)

Printed version of figures (if applicable) in color or black-and-white

- Indicate clearly whether or not color or black-and-white in print is required.
- For reproduction in black-and-white, please supply black-and-white versions of the figures for printing purposes.

For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.

AFTER ACCEPTANCE

Use of the Digital Object Identifier

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information. Example of a correctly given DOI (in URL format; here an article in the journal *Physics Letters B*): <http://dx.doi.org/10.1016/j.physletb.2010.09.059>

When you use a DOI to create links to documents on the web, the DOIs are guaranteed never to change.

Online proof correction

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor.

Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints

The corresponding author, at no cost, will be provided with a personalized link providing 50 days free access to the final published version of the article on ScienceDirect. This link can also be used for sharing via email and social networks. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent

once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/offprints>). Authors requiring printed copies of multiple articles may use Elsevier WebShop's 'Create Your Own Book' service to collate multiple articles within a single cover (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/booklets>).

AUTHOR INQUIRIES

You can track your submitted article at http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/89/p/8045/.

You can track your accepted article at <http://www.elsevier.com/trackarticle>. You are also welcome to contact Customer Support via <http://support.elsevier.com>.

© Copyright 2014 Elsevier | <http://www.elsevier.com>